

**FLORİDZİN MOLEKÜLÜNÜN OLASI GENOTOKSİK
VE ANTİGENOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN *in vivo*
ARAŞTIRILMASI**

Sindi VEKSHARI



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLORİDZİN MOLEKÜLÜNÜN OLASI GENOTOKSİK VE ANTI-
GENOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN
in vitro ARAŞTIRILMASI**

Sindi VEKSHARI
0000-0001-7975-3950

Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA– 2021
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Sindi VEKSHARI tarafından hazırlanan “FLORİDZİNİN MOLEKÜLÜNÜN OLASI GENOTOKSİK VE ANTİ-GENOTOKSİK ÖZELLİKLERİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULARI

Başkan : Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI İmza
0000-0002-4177-3478
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN İmza
0000-0002-5892-3735
Kırıkkale Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ İmza
0000-0002-1459-5485
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././.....

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/09/2021

Sindi VEKSHARI

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLORİDZİNİN MOLEKÜLÜNÜN GENOTOKSİK VE ANTI-GENOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI **Sindi VEKSHARI**

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Doğal bileşikler, çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkileri nedeniyle yıllar boyunca ilgi odağı olmuştur. Floridzin (Phl), anti-genotoksik, antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanser özelliklere sahip bir doğal bileşiktir. Bununla birlikte, Phl'nin insan lenfosit hücreleri üzerindeki anti-kanser ve anti-genotoksik etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmada, Phl'nin genotoksik/anti-genotoksik etkileri insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* genotoksisite testleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 4 sağlıklı donörden alınan insan periferik kan lenfositleri üzerinde, *in vitro* Kromozom Aberasyonu (CA), Mikronükleus (MN) ve Komet Testleri (CT) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada Phl'nin 125, 250 ve 500 µg/ml'lik dozları ve genotoksik ajan olarak kullanılan Mitomisin C (MMC)'nin 0,25 µg/ml'lik dozu kullanılmıştır. Ayrıca Phl'nin 125, 250 ve 500 µg/ml'lik dozları ile MMC'nin 0,25 µg/ml'lik dozu kombine halde kullanılmıştır. Phl'nin genotoksisiteyi inhibe ettiği değerlendirilmiştir. MMC ile muameleden önce, lenfositlerdeki anormalliklerin sıklığı kontrol ile benzer sonuçlar göstermiştir. Sonuç olarak MMC tek başına kromozom aberasyonu, mikronükleuslu hücre ve hasarlı DNA oranını anlamlı şekilde artırmıştır. Ayrıca kombine dozlarda, MMC'nin Phl ile etkileşimi sonucu DNA hasar oranında azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, kombine dozlarda, MMC+250µg/ml Phl dozunun uygulandığı kültürlerde MMC'nin neden olduğu DNA hasarında önemli ölçüde bir azalma gözlenmemiştir. Bulgularımız MMC ve Phl'nin kombine halde sinerjik bir etki gösterdiğini ve Phl'nin, MMC'ye karşı anti-genotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Anti-genotoksisite, Floridzin, Komet testi, Kromozom aberasyon, Mikronükleus testi, Mitomisin C
2021, x +106 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF POTENTIAL GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC PROPERTIES OF PHLORIDZIN *IN VITRO* **Sindi VEKSHARI**

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Natural compounds have been under focus for their protective effects against various diseases. Since they have few or no side effects, they have been recognized as an alternative for cancer treatments. One of these natural compounds is Phloridzin (Phl), which has been under investigation for its anti-genotoxic, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties. However, there is scarce information on its anti-cancer and anti-genotoxic effects on human lymphocyte cells. In this study, anti-genotoxic effects of Phl have been investigated on human peripheral blood lymphocytes, taken from 4 healthy donors. To demonstrate that Phl is a potential anti-genotoxic agent, three *in vitro* tests are performed: Chromosome aberration, Micronucleus and Comet tests. The isolated lymphocytes were incubated with nine different concentrations.

There were used 250 µg/ml doses of Phloridzin and 0,25 µg/ml doses of Mitomycin C (MMC). It was evaluated and confirmed, that Phl inhibited genotoxicity. Before treatment with MMC, the frequencies of aberrations in lymphocytes were similar to those control doses. MMC alone was shown to significantly increase the rate of chromosome aberrations, micronucleated cells and damaged DNA. Besides, in combined doses (Phl+MMC), the frequencies of DNA damages decreased by returning to lower values because of exposure of MMC to Phl. However, at combined doses, Phloridzin was not able to significantly reduce the rate of Mitomycin C-induced damage, particularly in MMC+250 µg/ml Phl. Combined, they showed a synergetic effect. As a conclusion, the results indicated that Phl exhibited an anti-genotoxic effect against MMC in tested concentrations *in vitro* on human lymphocytes.

Key words: Anti-genotoxicity, Chromosome aberration, Comet assay, Micronucleus test, Mitomycin C, Phloridzin

2021, x +106 pages.

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanım Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na beni öğrencisi olarak kabul ettiği için çok teşekkür ederim. Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında paha biçilmez rehberliği, tavsiyesi, sürekli desteği ve sonsuz sabrı için ona teşekkür etmek istiyorum. Eğitime ve bilime yönelik alçakgönüllü yaklaşımı, gelecekte ileriye taşımayı umduğum bir ilham kaynağıdır.

Arş. Gör. Dr. Mehmet Sarımahmut'a çalışmamdaki teknik desteği için teşekkür etmek istiyorum. Deneylerimi yürütmek ve tez yazım boyunca yardımını minnetle kabul ediyorum. Ayrıca deneylerin gerçekleşmesi için kan bağışında bulunan laboratuvar arkadaşıma, Merve Demirbağ ve diğer arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Uludağ Üniversitesi öğrencisi olduğum için şanslıyım.

Son olarak, bu uzaktan eğitim sırasında verdikleri akıllıca öğütler için anneme, babama ve kardeşime şükranlarımı sunarım. Son birkaç yılda onların muazzam anlayışları ve teşvikleri olmasaydı, çalışmamı tamamlamam imkansız olurdu. Beni özverili bir şekilde hayatta yeni yönler keşfetmeye ve kendi kaderimi aramaya teşvik ettiler.

Sindi VEKSHARI
22/09/2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZEL GELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Fitokimyasallar.....	7
2.1.1. Fitokimyasallar ve özellikleri.....	7
2.1.2. Polifenollerin kompozisyon ve sınıflandırılması.....	10
2.1.3. Fenolik bileşiklerin anti-kanser ve antioksidan etkileri.....	11
2.2. Floridzin.....	15
2.2.1. Floridzin tarihçesi.....	15
2.2.2. Floridzin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	16
2.2.3. Floridzin ekstraksiyonu ve eldesi.....	17
2.2.4. Floridzin'in antidiyabetik etki.....	18
2.2.5. Floridzin'in antioksidan aktivite.....	19
2.2.6. Floridzin'in anti-kanser aktivite.....	20
2.2.7. Floridzin'in genotoksik ve anti-genotoksik etkileri.....	21
2.2.8. Floridzin'in anti-inflamatuar etkiler.....	22
2.2.9. Floridzin'in hepatoprotektif etkiler.....	23
2.2.10. Floridzin'in kardiyoprotektif etki.....	23
2.2.11. Floridzin'in antibakteriyel etki.....	24
2.2.12. Floridzin'in kemiklerdeki etkisi.....	24
2.2.13. Floridzin'in toksik etkileri.....	24
2.2.14. Floridzin'in diğer fonksiyonları.....	25
2.3. Mitomisin C.....	26
2.3.1. Mitomisin C'nin anti-kanser etki mekanizmaları.....	27
2.3.2. Mitomisin C'nin yan etkileri.....	29
2.4. Genotoksik ve Karsinojenik Testler.....	29
2.4.1. DNA hasarları ve genotoksisite mekanizmaları.....	33
2.4.2. Kromozom aberasyon testi (CA).....	34
2.4.3. Mikronükleus testi (MN).....	37
2.4.4. Komet testi (CT).....	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.2. Lenfosit Hücreleri.....	43
3.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	43
3.4. Doz Seçimi.....	43
3.5. Kromozom Aberasyon (CA) Testi.....	44
3.6. Mikronükleus (MN) Testi.....	45
3.7. Komet Testi (CT).....	46
3.8. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	49
4.1. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi (CA) Sonuçları.....	49

4.2. <i>İn vitro</i> Mikronükleus Test sonuçları	57
4.3. Komet Testi (Tek hücre Jel Elektroforezi) Sonuçları	65
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	82
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
dk	Dakika
rpm	Dakikada devir sayısı
gr	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
µgr	Mikrogram
M	Molar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
CH ₃ COOH	Asetik asit
DSB	Çift zincir kırıkların
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
KH ₂ PO ₄	Di Potasyum Fosfat
Na ₂ HPO ₄	Di Sodyum Fosfat
dH ₂ O	Distille Su
DDR	DNA hasar yanıtını
WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonlarından
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı
EGCG	Epigallocatechin gallate
EtBr	Etidium Bromid
TCM	Geleneksel Çin Tıbbı
TIM	Geleneksel Hint Tıbbı
GHİ	Genetik hasar indeksi
GC	Genotoksikkarsinojenler
NGC	Genotoksik olmayan karsinojenler
HHY	Hasarlı hücre yüzdesi
CT	Komet testi
CA	Kromozom Aberasyon
CH ₃ OH	Metanol
MNBNC	Mikronükleerbinükleer lenfositlerin
MN	Mikronükleus testi
MMC	Mitomisin C
PBL	Periferik kan lenfositlerindeki
Phl	Phloridzin (Floridzin)
KCL	Potasyum Klorür
ROS	Reaktif oksijen türleri
Cyt. B	Sitokalazin B
NaOH	Sodyum Hidroksil
NaCl	Sodyum Klorür

SGLT	Sodyuma bağımlı glikoz taşıyıcılarını
SCGE	Tek hücreli jel elektroforezi
SSB	Tek zincirli kopmalar
UVB	Ultraviyole B

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser kemoprevensiyonunda fitokimyasallar.....	9
Şekil 2.2. Polifenollerin genel sınıflandırmaları.....	10
Şekil 2.3. Fitokimyasallar ve kanser tedavisinde kullanımları.....	12
Şekil 2.4. Farklı kanser evrelerinde fenolik bileşiklerin potansiyel koruyucu mekanizmaları.....	15
Şekil 2.5. Floridzin'in yapısı.....	16
Şekil 2.6. Floridzin ekstraksiyonu basamaklarını.....	18
Şekil 2.7. Floridzin'in potansiyel uygulamaları.....	26
Şekil 2.8. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.9 Genotoksisite ve kanserojenlik arasındaki ilişki.....	33
Şekil 2.10. Kromozom aberasyonlar türleri.....	36
Şekil 2.11. Invitro kromozom aberasyon testi.....	37
Şekil 2.12. Mikronükleüslü hücre oluşumu.....	38
Şekil 2.13. KometTesti'nin şematik görünümü.....	40
Şekil 4.1. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total kromozom aberasyon oranları (%).....	50
Şekil 4.2. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%MI) oranları.....	51
Şekil 4.3. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin cinsiyete göre total aberasyon oranları.....	53
Şekil 4.4. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin cinsiyete göre mitotik indeks (%MI) oranları.....	54
Şekil 4.5. İnsan lenfosit hücrelerinde gözlemlenen anormal kromozomların temsili mikroskop görüntüsü (1000x).....	55
Şekil 4.6. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde elde edilen NDI oranları (%).....	57
Şekil 4.7. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN oranları (‰).....	58
Şekil 4.8. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde elde edilen NDI oranlarının cinsiyete göre dağılımı (%).....	60
Şekil 4.9. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN oranlarının cinsiyete göre dağılımları (‰).....	61
Şekil 4.10. Hücrelerin mikroskopik incelemelerinde gözlemlenen nükleus tomurcuklanması (bud) ve mikronükleus örneklerinin temsili görüntüleri (400x).....	62
Şekil 4.11. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı değerleri.....	66
Şekil 4.12. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu değerleri.....	67
Şekil 4.13. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu değerleri.....	68
Şekil 4.14. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu değerleri.....	69
Şekil 4.15. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA değerleri.....	70
Şekil 4.16. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu değerleri.....	71

Şekil 4.17. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Kuyruk Momenti değerleri.....	72
Şekil 4.18. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA değerleri.....	73
Şekil 4.19. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi değerleri.....	77
Şekil 4.20. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Hasarlı Hücre Yüzdesi değerleri.....	77
Şekil 4.21. İnsan lenfositlerinde hasarlı DNA varlığı ile gözlemlenen Komet oluşumlarının sınıflandırılması.....	78
Şekil 4.22. A) Apoptotik cisimler (CA); B) Apoptotik hücre (MN); C) Apoptotik hücre (CT).....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Floridzin'in özellikleri.....	17
Çizelge 4.1. Floridzin ve Mitomisin C ile tedavi edilen her donörün lenfosit kültüründe kromozom aberasyonlarının indüksiyonu ve mitotik indeks değerleri.....	48
Çizelge 4.2. Floridzin ve Mitomisin C ile tedavi edilen her donörü lenfosit kültüründe cinsiyete göre kromozom aberasyonlarının indüksiyonu ve mitotik indeks değerleri...	52
Çizelge 4.3. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testi ile elde edilen nükleer bölünme indeksi, mikronükleus ve nükleer anomalilerin sayısal değerleri.....	56
Çizelge 4.4. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testi ile elde edilen nükleer bölünme indeksi, mikronükleus ve nükleer anomalilerin cinsiyete göre dağılımları.....	59
Çizelge 4.5. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerleri.....	64
Çizelge 4.6. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri.....	73
Çizelge 4.7. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri.....	75

1. GİRİŞ

Antik çağlardan beri bitkiler çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Tıbbi bitkilerin kullanımı 60.000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Sumner J, 2000). Geçmişten günümüze, bitkileri toplama ve işleme gibi süreçler nesilden nesile aktarılmıştır. Bu bitkiler bilimsel ilaç olarak tanımlanamasa da modern tıbbın temelini oluşturmaktadır (Ogbonna ve ark., 2012; Fridlender ve ark., 2015).

On sekizinci yüzyılın sonunda, hem teknik hem de organik ve analitik kimyadaki gelişmelerle birlikte, bitkilerin, tedavi amaçlı kullanıma uygun hale getirilmesi kolaylaşmıştır. Böylece, ilaç geliştirme çalışmaları da hız kazanmıştır. *Papaver somniferum* bitkisinden morfin analjezik ilacın ekstraksiyonu, ilaç geliştirmenin ilk adımını oluşturmaktadır. Daha sonra farmasötik amaçlı çok sayıda bitkisel ilaç üretilmiştir. (Newman ve ark., 2000; Butler, 2004; Ogbonna ve ark., 2012). İlk bitki kökenli ilaçlar, farmakoloji biliminin gelişiminde bir dönüm noktası olmuştur (Newman ve Cragg, 2016).

Bitkilerde bulunan doğal maddeler olan fitokimyasallar, ilaç geliştirme sahasında yeni ilaçların üzerine dayandırıldığı ve esin kaynağı olarak yararlanılan önemli bir molekül grubudur. Fitokimyasallar, meyvelerde, sebzelerde, tıbbi/aromatik bitkilerde, köklerde, çiçeklerde veya bitkilerin yapraklarında bulunan, bitkiye tat, renk ve aroma veren doğal bileşiklerdir (Vasanthi ve ark., 2012). Fitokimyasallar insanlar tarafından tüketilen temel besinler değildir.

Fitokimyasallar oksidasyona karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır. Çevremizdeki ortam son derece oksidatiftir ve birçok metabolik süreç oksidan gelişimine yol açmaktadır. Birçok araştırmacı, özel biyolojik değerlere ve aktivitelere sahip fitokimyasalların tespiti ve izolasyonuna odaklanmıştır; ancak, mevcut fitokimyasalların sadece küçük bir yüzdesi ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Muceniece ve ark., 2016). Fitokimyasalların bir kısmı, şu ana kadar sağladıkları olumlu sağlık katkılarından dolayı insan sağlığını korumak için yaygın olarak diyet ve ilaç takviyesi olarak kullanılmaktadır (Rios ve Recio, 2005; Naghibi ve ark., 2013; Lemma ve ark.,

2017). Fitokimyasallar çeşitli bitkilerden elde edilmektedir. Bir fitokimyasal olan Floridzin (Phl), dünya üzerinde yaygın bulunan ve insan sağlığı üzerine faydalı etkileri olan elma meyvesinden elde edilmektedir (Niederberger ve ark., 2020).

Bilindiği gibi insan vücudunda oksidanların (reaktif oksijen ve nitrojen türleri) üretimi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. İnsanlar dahil tüm organizmalar, antioksidan komplekslerle karşı savunma mekanizmaları geliştirmekte, ancak bu yeterli gelmemektedir. Oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklarda ve kanserde rol oynadığı bilinmektedir (Boyer ve Liu, 2004). Antioksidan fitokimyasalların, oksidatif hasar sonucu gelişen hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Sung ve Lee, 2010; Soobrattee ve ark., 2005). İnsan kanının oksidatif kapasitesini artırarak polifenollerin kırmızı kan hücrelerine bağlanması buna bir örnektir (Koren ve ark., 2010). Ayrıca, antioksidan fitokimyasalların çoğunda anti-enflamatuar özellikler tanımlanmıştır (Wu ve ark., 2012; Deng ve ark., 2012).

Ek olarak, bugüne kadar yapılan çalışmalar, fitokimyasalların yüksek alımının, kanser riskinin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Johnson, 2007; Key, 2011; Block ve ark., 1992). Aslında fitokimyasallar, meyve, sebze ve bitkilerden elde edilen besleyici olmayan bileşiklerdir. Bu bileşikler, kanser önleyici ve iltihap önleyici ajan olarak davranmalarını sağlayan benzersiz özelliklere sahiptir (Srivastava ve ark., 2015). Bugüne kadar 10.000'den fazla fitokimyasal keşfedilmiştir ve bazıları anti-kanser özelliklerinden dolayı kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Chukwuebuka ve Chinenye, 2015). Ayrıca fitokimyasallar, kanser önleyici ilaçların etkisini artırırken yan etkilerini de azaltma potansiyeline sahiptir (Siddique ve ark., 2010; Tan ve ark., 2011). Dahası, fitokimyasallar antioksidan enzimleri aktive ederek etki ettikleri için çevresel kanserojenlere karşı daha yüksek bir koruma sağlamaktadır. Fitokimyasallar, DNA onarımında rol alırlar ve kanserin ilerlemesini engellerler. Çok çeşitli fitokimyasallar vardır, ancak en yaygın ve en iyi bilinen polifenol grubudur. Bununla birlikte, fitokimyasallar veya bunlardan zengin besinler, sahip oldukları sağlık yararları nedeniyle tıp alanında birçok çalışmanın parçası haline gelmektedir (Thomas ve ark., 2015).

Son yıllarda kanser hastalarının tedavisinde anti-kanser ve kemoprotektif etkilerinden dolayı kanser önleyici özelliklere sahip fitokimyasallara odaklanılmıştır. Bu fitokimyasallar geleneksel kanser tedavilerinin yan etkilerini azaltmaktadır. Kanıtlar, eski çağlardan beri kullanılan şifalı bitkilerin çeşitli tümörlerin önlenmesi ve bastırılmasında rol oynadığını göstermektedir (Premalatha ve Rajgopal, 2005). Ek olarak, fitokimyasalların DNA hasarına karşı koruma sağladığını gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bitki dünyasında güçlü fito-antimutajenlerin varlığının ortaya konduğu daha fazla keşif yapılmaktadır (De Flora ve Ferguson, 2005; Ferguson ve ark., 2005; Liu, 2004).

Antimutajenler, desmutajenler ve biyo-antimutajenler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Desmutajenler, genotoksik ajanların vücuttan atılmasına yardımcı olan maddeleri içermektedir. Aynı zamanda, DNA'yı hedeflemeden önce, mutajenleri kimyasal veya enzimatik aktivite yoluyla kısmen veya tamamen inaktive eden maddeleri de içermektedir. Öte yandan, DNA yapısı mutajenlerden etkilenmiş ise biyo-antimutajenler mutasyon sürecini baskılayarak hasarlı DNA'nın tamirinde rol alan faktörler olarak ortaya çıkmaktadırlar (De Flora ve Ferguson, 2005; Słoczyńska ve ark., 2014).

Bununla birlikte, anti-genotoksik ve anti-kanser ajanların spesifik etki mekanizmaları mevcuttur. Bu maddeler vücudu mutajenlerden ve kanserojenlerden korur veya bunların olumsuz etkilerini minimize ederler. Kanserojenik hastalıkların önlenmesinin, transmembran taşınmasının modifikasyonu, metabolizmanın modülasyonu, hücre replikasyonunun inhibisyonu, DNA yapısının korunması, DNA onarımı gibi mekanizmalarla sağlanabileceği gözlenmiştir. Bu, proteazları ve hücre proliferasyonunu inhibe eder, hücre farklılaşmasını destekler ve apoptozu modeller (De Flora ve Ferguson, 2005; Ferguson ve ark., 2004).

Genotoksikoloji, genetik materyali etkileyen çok çeşitli ajan ve faktörleri araştırmayı hedeflediğinden, farklı tip genotoksik etkileri izlemek için farklı testler geliştirilmiştir. Bu analizler, çeşitli maddelerin genotoksik veya anti-genotoksik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır (Kaur ve ark., 2018; Brusick, 1988; Afilev ve Glaser, 2013). Bu amaçla kullanılan en yaygın testler, Kromozom aberasyon testi (CA),

Mikronükleus testi (MN), Komet testi (CT), Ames testi, Kardeş kromatid değişimi gibi genotoksisite testleridir (Bhattachar, 2011; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Costa ve ark., 2015; Majer ve ark., 2001; Liao ve ark., 2009).

Fitokimyasallar çeşitli bitkilerden elde edilmektedir. Bir fitokimyasal olan Floridzin (Phl), dünya üzerinde yaygın bulunan ve insan sağlığı üzerine faydalı etkileri olan elma meyvesinden elde edilmektedir (Niederberger ve ark., 2020). Phl ilk olarak, yaklaşık 180 yıl önce ateş ve sıtma tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde ise diyabet tedavisinde potansiyel bir etkiye sahiptir, ancak yine de gözden geçirilmesi gereken bazı sınırlamalar vardır (Kumar ve ark., 2019). Ayrıca, antioksidan, anti-enflamatuvar, hepatoprotektif, anti-kanser, anti-genotoksik, anti-bakteriyel ve kardiyoprotektif aktiviteleriyle de dikkat çekmektedir (Tian ve ark., 2021).

Bu çalışmada, Phl'in genotoksisite ve/veya anti-genotoksisite açısından güvenilirlik sınırları insan lenfositlerinde *in vitro* Kromozom Aberasyonu, Mikronükleus ve Komet testleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun yanı sıra, Phl ve Mitomisin C (MMC) etkileşimleri de genotoksisite ve/veya anti-genotoksisite açısından değerlendirilmiştir. MMC, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1974 yılında onaylanan, anti-tümör özelliklere sahip bir antibiyotiktir. MMC, çeşitli tümör tiplerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Doll ve ark., 1985). Bu çalışmada, genotoksik bir anti-kanser ajan olan MMC, Phl ile kombine edilerek ortaya çıkan genotoksik etki değişimleri Kromozom aberasyonu, Mikronükleus ve Komet testleri aracılığıyla değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Kanser, hücrelerin normal büyüme ve farklılaşma özelliklerini kaybetmesi sonucu kontrolsüz çoğalan hücrelerden oluşan kompleks bir hastalıktır. Bu hastalık, dünya genelinde insan ölüm nedenlerinde de ilk sıralarda gelmektedir. Kanser gelişimi çok basamaklı bir süreçtir; başlangıç hücresinde meydana gelen mutasyonların birikmesi sonucu kontrolsüz büyüme ve çoğalmayı takiben invazyon, kanser oluşumunun genel basamaklarını oluşturmaktadır. (Bray ve ark., 2018).

Tümör kitle cerrahisi ile tedavi, en eski ve temel yöntemlerden biridir, ancak aynı zamanda bir risk taşıır. Çoğu kanser daha hızlı yayılabildiğinden, uzmanlar ameliyat yoluyla kanseri kontrol edememe durumuyla karşılaşabilir. Ayrıca, bir doku veya organın cerrahi müdahaleyle çıkarılmasının ardından, hastanın iyileşmesine yardımcı olduğu için, birçok tümörde adjuvan tedavilerin eklenmesi gerekir (Costa, 2021).

Radyasyon tedavisi, iyonlaştırıcı radyasyonun, X-ışınları, gama ışınları veya nötronlar gibi atom altı parçacıkların kanser hücrelerinin tahrip edilmesi amacıyla kullanılmasıdır. Kanser teşhisi konan tüm insanların yaklaşık %50'si radyasyon tedavisi görmektedir. Tedavide maruz kalınan radyasyon, hücrelerde genetik hasar oluşumunu indükler ve hücreleri çoğalamaz hale getirebilir. Bununla birlikte radyasyon, apoptozu tetikleyebilen önemli bir faktördür. Radyasyon tedavisi etkili bir yöntem olmasına rağmen, tümör boyutunun büyüklüğü tedavi etkinliğini kısıtlar. Radyasyon, esas olarak tümörün çevresinde, merkezine göre daha büyük yıkıcı etkiye sahiptir. Daha yararlı sonuçlar elde etmek için cerrahi işlemler radyasyon tedavisinin bir kombinasyonu biçiminde ortaya çıkmaktadır (Costa, 2021).

Genel olarak kemoterapi, kanseri iyileştirmeye yardımcı olan çeşitli kimyasal bileşiklerin kullanılması olarak tanımlanabilir. Bu tedavi şekli diğerlerine kıyasla avantajlara sahiptir çünkü kimyasallar, kan dolaşımı yoluyla tümörün herhangi bir yerine yayılabilir. Bu tedavinin olumsuz tarafı ise kanser hücrelerinin ilaçlara karşı direnç geliştirebilmesidir. Bunun sonucunda apoptoz sürecinin uyarılması indüklenemeyebilir. İkincisi, kimyasalların tümörün içine ulaştıklarında kanser hücreleri

tarafından atılımını içeren bir mekanizmadır. Ayrıca kemoterapinin en olumsuz etkilerinden biri kanser hücrelerine ek olarak yeni ve sağlıklı hücrelerde de bu ajanlara maruziyet sonrası hücre ölümünün indüklenmesidir (Costa, 2021).

Araştırmacılar kanseri tedavi etmek için başka ve yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Bunlardan biri "hedefe yönelik tedavi"dir. Kemoterapiye benzeyen ancak molekülleri daha az toksik olan bu terapide, kanserin vücutta yayılmasına neden olan, tümöre gelişimsel avantaj kazandıran spesifik proteinler hedeflenmiştir. Bu terapinin dezavantajı, tedavi sırasında hedef proteinin bir mutasyon sonucu yapısının değişmesiyle tedavinin işlevini yitirebilmesidir. Bilim insanlarının yeni geliştirdiği hedefli tedaviler arasında gen ekspresyon modülatörleri, apoptoz indükleyicileri, anjiyogenez inhibitörleri ve immünoterapiler gibi farklı tedavi türleri bulunmaktadır (Smith, 2021).

Kanser tedavisinde, vücut üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip bir terapi için, bitki bazlı ürünler, fitokimyasallar üzerinde durulmaktadır. Fitokimyasallar diyetimizin bir parçasıdır ve bu moleküllerin antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-proliferatif aktivite gibi bir dizi işlevleri bulunmaktadır. Fitokimyasallar üzerine yapılan son araştırmalara dayanarak, bunların hastalığın ilerlemesi ve metastaz üzerinde olumlu bir etkiye sahip oldukları keşfedilmiştir. Dünya Kanser Araştırma Fonlarından (WCRF) elde edilen veriler, fitokimyasal yönden zengin günlük diyet uygulayan bireylerin kansere yakalanma riskinin daha düşük olduğunu açıklamaktadır (Thomas ve ark., 2015).

Fitokimyasallar, kansere karşı mücadelede umut verici bir gelecek sunduğundan, *in vivo* ve *in vitro* testlerle bilimsel olarak test edilirler. Elde edilen verilere göre, 1940 ile 2014 yılları arasında kanseri iyileştirmek için kullanılan ilaçların yaklaşık % 50'sinin bitki kökenli olduğu gösterilmiştir (Newman ve Cragg, 2016). Genel anlamda, fitokimyasalların anti-kanser etki mekanizmaları, karsinogenezisi yavaşlatan tamamlayıcı mekanizmaları, serbest radikalleri süpürücü mekanizmaları, malign hücrelerin hayatta kalmasını ve bölünmesini baskılayan ve tümör anjiyogenezini azaltan mekanizmaları içermektedir (Lee ve ark., 2013; Lu ve ark., 2018a; Yan ve ark., 2018).

Buradaki perspektif, bitkilerin farmakoloji alanının gelişiminde önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir. Farklı bilimsel alanların güçlü bir etkileşim halinde olması, yeni ilaçların ve tedavi yaklaşımlarının temellendirilmesini kolaylaştıran ve buna katkıda bulunan bir başlangıç noktasıdır (Choudhari, 2020). Fitokimyasallar, diğer terapilerle kombinasyon halinde, kanser için başarılı bir tedaviye ulaşmada büyük bir potansiyele sahip olabilirler.

2.1. Fitokimyasallar

2.1.1. Fitokimyasallar ve özellikleri

Antik çağlardan beri bitkiler, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayurveda veya Geleneksel Hint Tıbbı (TIM) ve Geleneksel Çin Tıbbı (TCM), çeşitli bitkilerin kullanımına dayanmaktadır. Geleneksel Tıbbın tarihi MÖ 4500'lere kadar uzanmaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçlar henüz bilimsel bir ilaç tanımlama sisteminin parçası değildir (Ogbonna ve ark., 2012, Fridlender ve ark., 2015).

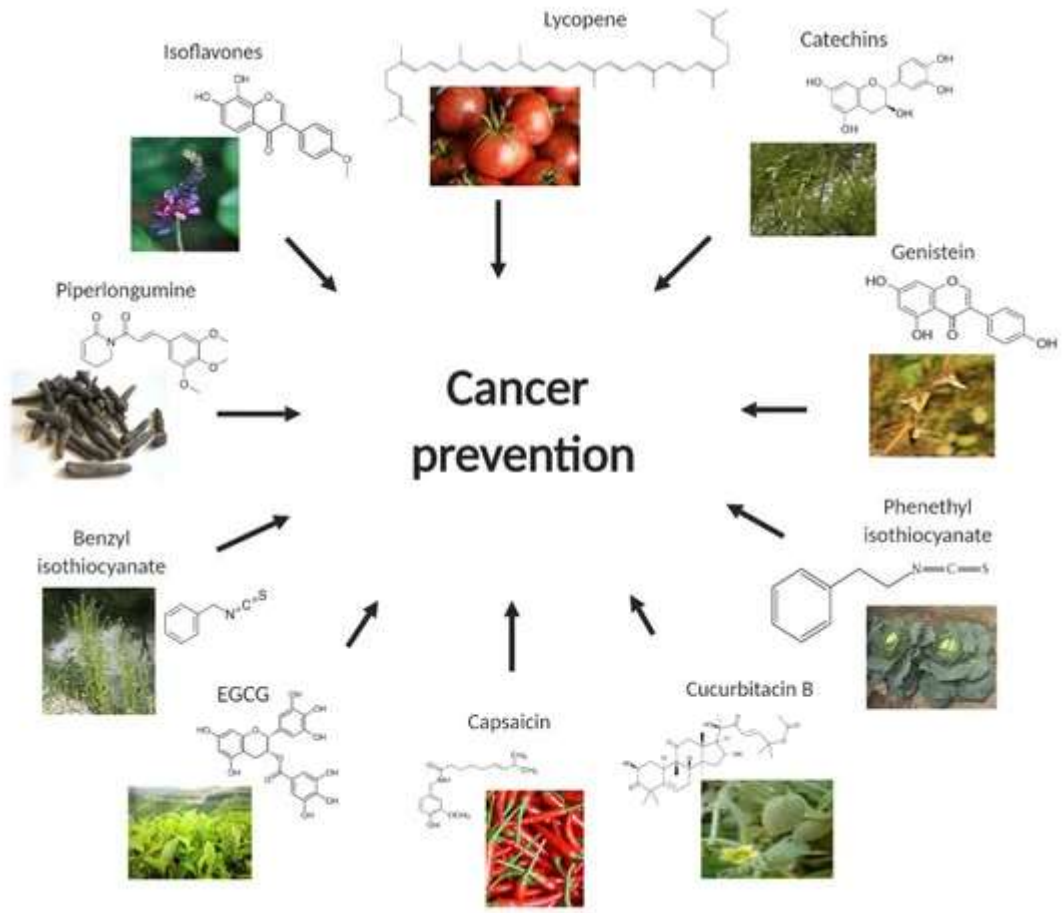
18. yüzyılın sonunda diğer tıbbi alanların gelişmesinden etkilenen bu şifalı bitkilerin gelişiminde önemli bir dönüm noktası getirdi. Yeni ilaçların keşfi bir yenilikti ve ilk gösterge, analjezik ilaç morfininin *Papaver somniferum* bitkisinden izole edilmesiydi. Bu, ilaçların geliştirilmesi ve iyileştirilmesi açısından bir büyük bir sıçramadır ve bunun dolayısıyla da bitkilerden ticari ilaçların üretilmesi sağlanmıştır. Örnek olarak aspirinin öncüsü salisilik asit (*Salix* sp.), kokain (*Erythroxylum coca*), kinin (*Cinchona officinalis*), digitoksin (*Digitalis purpurea* ve *Digitalis lanata*) ve farmasötik ve klinik potansiyeli olan diğer ilaçlar verilebilir (Newman ve ark., 2000; Butler, 2004; Ogbonna ve ark., 2012). 1981'den 2014'e kadar olan dönem bitkiler açısından başarılıdır çünkü onaylanan ve kullanılan ilaçların yarısından fazlası bitkiseldir (Newman ve ark., 2016). Bu, aynı zamanda bitki dünyasının tıbbi özellikler için tükenmez bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Bitki metabolitleri birincil ve ikincil olarak sınıflandırılır. Birincil metabolitler, solunum veya fotosentez gibi tüm bitki fonksiyonlarının büyümesi ve gelişmesinde doğrudan rol

oyun. Bu grup, bitki gelişimi için gerekli proteinleri, lipitleri, nükleik asitleri, karbonhidratları ve diğer tüm elementleri içerir. Öte yandan, ikincil metabolitler, birincil metabolitlerin edinimi sırasında türetilen bir grup bileşiği temsil eder. Bitki gelişimi için doğrudan gerekli olmamalarına rağmen, gelişimine dolaylı olarak katılırlar (Scalbert ve Williamson, 2000; Erb ve Kliebenstein, 2020; Broun, 2005; do Nascimento ve Fett-Neto, 2010).

Fitokimyasallar, bitkiler tarafından üretilen ve savunma mekanizmalarında rol oynayan, bitkiye renk, tat, koku ve aromasını veren primer veya sekonder metabolitlerdir; koruyucu veya hastalık önleyici özelliklere sahip esansiyel olmayan bitki kimyasallarıdır (Budisan ve ark., 2017). Bitkilerin bu kimyasalları kendilerini korumak için ürettiği bilinmektedir, ancak araştırmalar bu kimyasalların insanları da hastalıklara karşı koruyabildiğini göstermektedir. Çok sayıda kanıt, fitokimyasalların ve bunların türevlerinin antioksidan, anti-enflamatuvar ve anti-proliferatif aktivite sergiledikleri için insan sağlığı yararları için olumlu bir kaynak olduğunu göstermektedir (Iqbal ve ark., 2019).

Bugüne kadar, çok çeşitli fitokimyasallar ve bunların türevleri bilinmektedir (Şekil 2.1). Form ve yapılarıdaki çeşitlilik nedeniyle fitokimyasallar iki temel gruba ayrılır. Klasik olarak fitokimyasallar, bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak birincil veya ikincil metabolitler olarak sınıflandırılır. Birincil metabolitler, yaygın şekerler, amino asitler, proteinler, nükleik asitlerin, klorofillerin vb. pürinleri ve pirimidinlerini içerir. İkincil metabolitler ise alkaloidler, terpenler, flavonoidler, lignanlar, bitki steroidleri, kurkuminler, saponinler, fenolikler ve glikozitler gibi bitki kimyasallarının geri kalan kısmından oluşmaktadır (Hahn, 1998; Ramawat ve ark., 2009). Fitokimyasallar içinde en büyük ve en iyi incelenmiş grup polifenollerdir. Bilinen fitokimyasallar arasında kişinin alabileceği günlük polifenol miktarının 1 gr'ın üzerinde olması önerilmektedir. Bu, diğer tüm fitokimyasallardan ve antioksidanlardan yaklaşık 10 kat daha fazla olan önemli bir miktardır. Dolayısıyla, onları tüketmekten kaynaklanan sağlık yararları gün geçtikçe vurgulanmakta ve özellikle anti-kanser mekanizmaları açısından daha dikkatli düşünülmesi gereken bir konudur (Bauer ve ark., 2012; Uzzo ve ark., 2004).

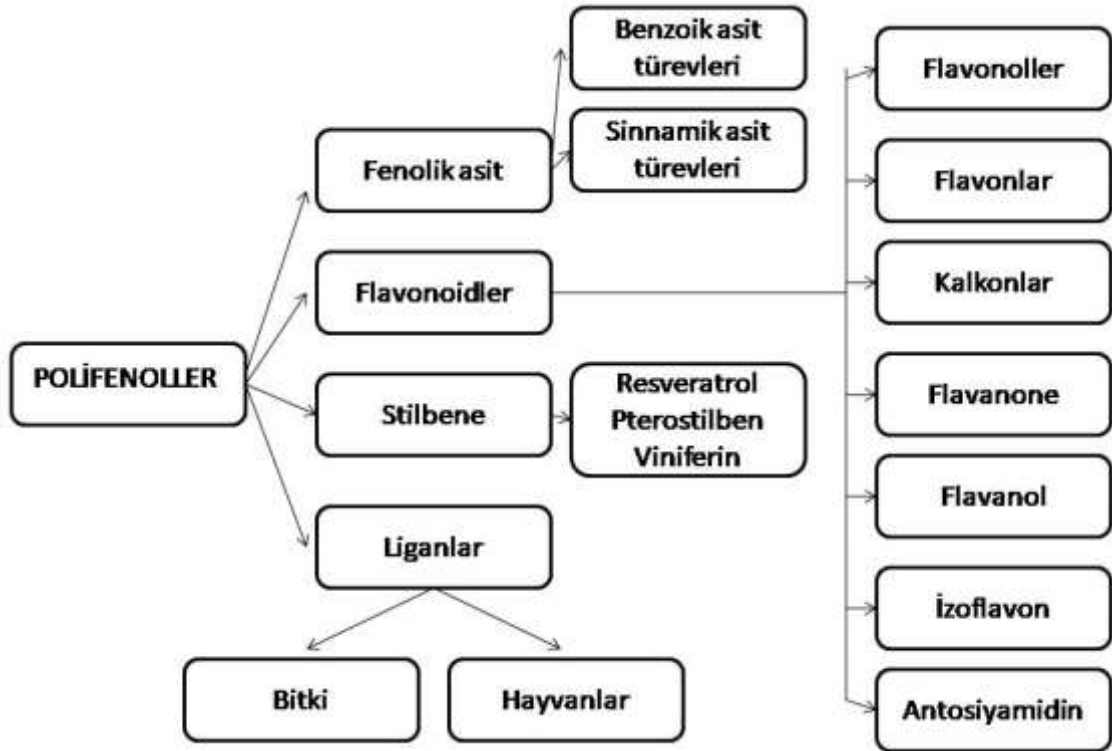


Şekil 2.1. Kanser kemoprevensiyonunda fitokimyasallar (Ranian ve ark., 2019)

Bilimsel olarak, "polifenol" veya "fenolik" terimleri, halka yapılarında diğer fonksiyonel gruplarla (eterler, aldehitler, tiyolatlar vb.) Birlikte bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren maddeler olarak açıklanır. Başka bir açıklamada, "fenol" ve "polifenol" terimi arasındaki fark, fenollerin fenil halkalarına bağlı bir veya daha fazla hidroksil ikame edicisine sahip olduğunu açıklar. Polifenoller ise çift halkalarına bağlı bir hidroksil grubu veya bir hidroksil grubu ikame edicisine sahip bileşikler olarak tanımlanır. Fenollerin kimyasal yapısı C_6H_5OH olarak ve bir fenil halkasına bağlı bir hidroksil (-OH) grubu yapısı ile sunulur (Harbone, 1989; Balasundram ve ark., 2006; Ghasemzadeh ve Jaafar, 2014).

2.1.2. Polifenollerin kompozisyon ve sınıflandırılması

Fenolik bileşikler, bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler, sağlığa daha yararlı özelliklere sahip olmaları nedeniyle yaygın olarak bilinmekte ve dikkate alınmaktadır (Ornston ve Yeh, 1979; Lattanzio, 2013; Lehfeldt ve ark., 2000; Vickery M.L. ve Vickery B., 1981). Ayrıca, fenolik bileşikler 2 ana gruba ayrılır: suda çözünmeyen (tanenler, odun özü ve hidroksisünamik asitler) ve suda çözünür (kinonlar, flavonoidler, fenilpropanoidler ve fenolik asitler) (Şekil 2.2). Bu sınıflandırma, çözünürlükleri ve gastrointestinal sistem üzerindeki etkileri açısından büyük önem taşımaktadır. Çözünmeyen fenoller, organizma tarafından sindirilemezler ve bunun sonucunda vücuttan atılmaktadırlar. Çözünür fenoller ise sindirilerek kan yoluyla bağırsağa taşınmaktadır (Manach ve ark., 2004; Aguilera ve ark., 2016; Naczki ve Shahidi, 2004).

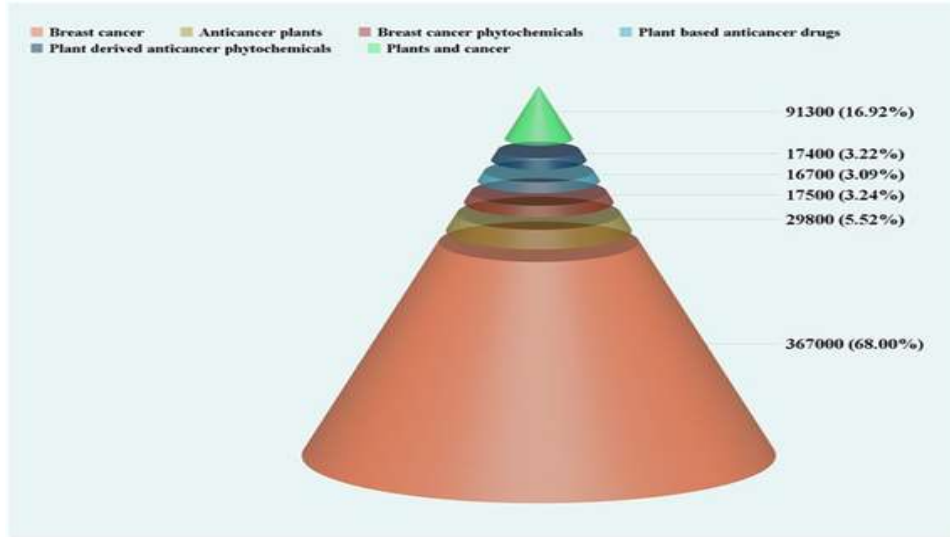


Şekil 2.2. Polifenollerin genel sınıflandırmaları (Kumar ve ark. 2019)

2.1.3. Fenolik bileşiklerin anti-kanser ve antioksidan etkileri

Çok sayıda bilimsel araştırma, fitokimyasalların anti-kanser özellik sergilediğini göstermektedir (Şekil 2.3). Bu bileşikler, karsinogeneizde etkili olan, serbest radikal oluşumu, kontrolsüz çoğalma, anjiyogenez, invazyon ve metastazı engelleyen mekanizmalara sahiptir (Lee ve ark., 2013; Lu ve ark., 2018a; Yan ve ark., 2018).

Dünya Kanser Araştırma Fonu tarafından yapılan son incelemelere göre, fitokimyasallar açısından zengin gıdalar tüketmek kansere yakalanma olasılığını düşürmektedir. (Block ve ark., 1992; Key ve ark., 2011). Düşük oranda prostat kanseri gelişimi, karnabahar, turp, brokoli gibi sebzelerin yüksek tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (Joseph ve ark., 2004). Akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde, soğan gibi flavonoid içeriği yüksek besinleri tüketmenin kansere yakalanma riskini düşürdüğü gösterilmiştir (Knekt ve ark., 1997; Murphy ve ark., 2000). İlâveten, antoksanin içeren bitter çikolatanın kolon kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (Rodriguez-Ramiro ve ark., 2011). Yüksek yeşil çay tüketimi, prostat, yumurtalık, meme ve özofagus kanseri riskini azaltmıştır (Sun ve ark., 2007; Wu ve ark., 2004). Ayrıca, son çalışmalar, kahve tüketiminin cilt kanseri riskini azaltıcı etkisini ortaya koymuştur (Song ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Fitokimyasallar ve kanser tedavisinde kullanımları. Grafiğe bakıldığında 2010-2017 yıllarına ait literatürde kanser hastalığı ve tedavisi alanındaki araştırmacıların temel amacının fitokimyasallara odaklandığı açıktır (Iqbal ve ark., 2017).

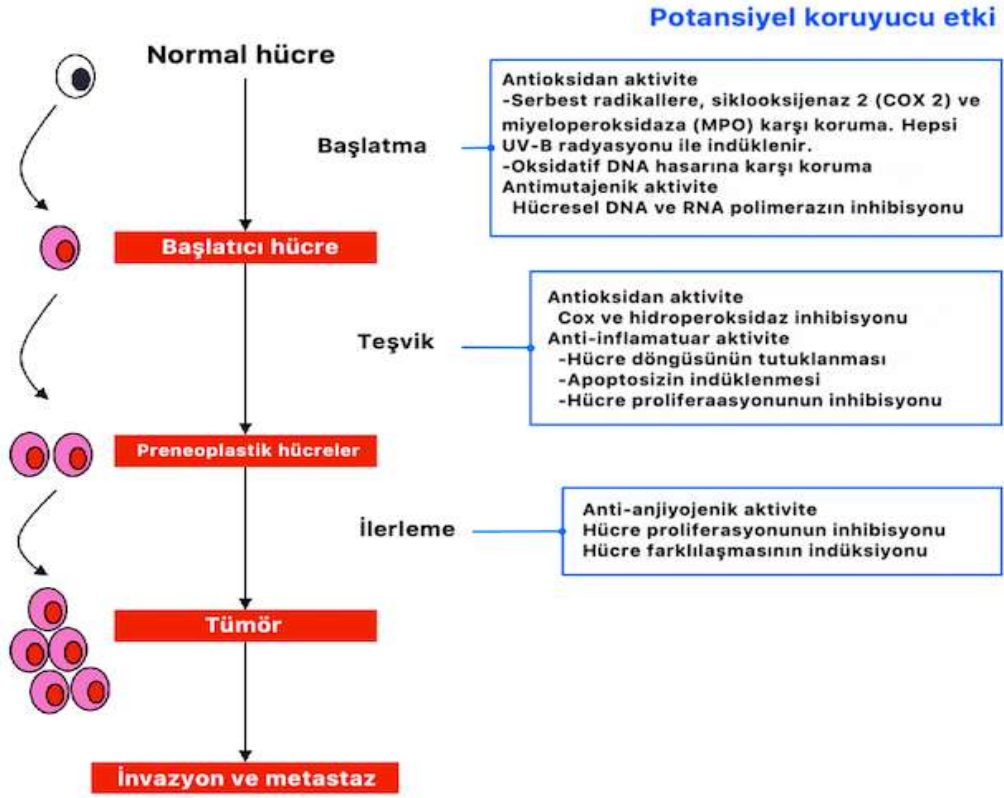
Meme kanserinden kurtulan, sonrasında bol miktarda meyve ve sebze tüketen kadınlarda hastalığın tekrarlama olasılığının üç kat azaldığını gösteren kanıtlar mevcuttur (Pierce ve ark., 2007). Şangay'da yapılan bir başka önemli çalışma, kanser savaşlarından kurtulan kadınlar tarafından polifenol, flavanon ve izoflavon bakımından zengin gıdaları tüketmenin önemini gösterdi. Fenolik madde açısından zengin bir beslenme rejiminin, meme kanseri hastalığının tekrarlama olasılığını %29 azalttığı bulunmuştur (Boyapati ve ark., 2005).

Fitokimyasalların etki alanı karmaşık olduğu kadar geniştir ve bu nedenle de hâlâ incelenmektedir. Fitokimyasallar, antioksidanların aktivasyonu yoluyla hastalığın önlenmesine veya gelişimine etki etmektedir. Antioksidan aktivite iki yönde gerçekleşmektedir; birincisi, serbest radikallerin absorpsiyonu, ikincisi ise moleküler düzeyde bir dizi mekanizmanın etkisi altında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon gibi antioksidan enzimlerin indüksiyonudur (Şekil 2.1.3.1, Reuland ve ark., 2013; Johnson, 2007). Bilinen moleküler mekanizmalardan biri, Nrf2'nin aktivasyonu ile ilgilidir. Bu sistem sayesinde, antioksidan enzimleri kodlayan ilgili genler ve detoksifikasyon aktive edilmektedir (Reuland ve ark., 2013; Johnson, 2007).

Fitokimyasalların antioksidan özelliklerinin anlaşılması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Antioksidan etkilerini göstermenin somut bir örneği, evde kullanılan deterjanlarda yaygın olarak bulunan bir bileşen olan kanserojen olan karbon tetraklorür'dür. Çalışma, sağlıklı hücrelerin bu kanserojene maruz kalmasını içermektedir. Kurkumin varlığında, hücrelerin düşük bir karsinogenez gelişim oranına sahip olduğu görülmüştür (Sood ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, Kaempferol açısından zengin diyet uygulayan bireylerin serum ve idrarlarının analizi sonucu, bu bireylerin daha yüksek SOD aktivitesi ve daha yüksek polifenol konsantrasyon oranına sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1.3.1, Kim HY ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada, sigara dumanına maruz bırakılan farelerde, sebzelerde bulunan önemli bir fitokimyasal olan indol-3 karbinol diyeti uygulanan farelerin diyet uygulanmayan farelere göre akciğer kanseri geliştirme riskinin düşük olduğunu gösterilmiştir (Morse ve ark., 1990). Sandhir ve Mehrotra (2013), 3-nitropropionik asitin neden olduğu mitokondri hasarının, kuersetin varlığında iyileşme gösterdiğini belirtmiştir. Son zamanlarda, etin

biberiye ve kekik ile pişirilerek tüketiminin, kanserojen heterosiklikamin (HCA) seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Smith (2007) makalesinde, bu fitokimyasalları diyetle alan bireylerin almayanlara kıyasla %87 daha düşük HCA oranına sahip olduğunu söylemektedir. Fenolik bileşikler antioksidan özelliklerinin yanı sıra, antiinflamatuvar etkiye de sahiptirler. Enflamasyon, oksidatif stres ve transkripsiyon faktör ailesi NF- κ B'nin aktivasyonu ile yakın etkileşim içerisindedir. Yaban mersini içerisindeki yeşil çay, kuersetin, kurkumin, kafeik asit gibi fitokimyasallar, NF- κ B sinyal yolağının inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır (Reuland ve ark., 2013; Carlsen ve ark., 2010).

Fenolik bileşiklerin, hücrel mekanizmaların modifikasyonu ve iyileştirilmesi yoluyla karsinogenez sürecine etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Johnson, 2007). Nar meyvesi, elajik asit polifenolü bakımından zengindir. Bu fitokimyasalın, prostat kanseri hücrelerinde, bu hücrelerin büyümelerini inhibe ederek ve apoptoz sürecini uyararak hücreleri doğrudan etkilediği gösterilmiştir (Malik ve ark., 2005). Ayrıca nardan ekstrakte edilen meyve suyu, meme kanseri hücre hatları ile ilgili tüm metastatik süreçleri inhibe etmede anahtar bir rol oynamaktadır (Lansky ve ark., 2005). Nar özü üzerine yapılan başka bir çalışmada, meme kanseri hücrelerini çeken ve onları kemiklere yönlendiren bir kemokiniinhibe edebildiği gösterilmiştir (Rocha ve ark., 2012). Kurkumin, apoptozu hızlandırarak kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyen bir başka önemli fitokimyasaldır (Somasundaram ve ark., 2002; Park ve ark., 2015; Butterfield ve Keller, 2012; Zhang ve ark., 2007). Kurkumin ayrıca, sağlıklı hücrelere zarar vermeden, meme kanserinde, kanser kök hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (Dorai ve ark., 2000). Ayrıca, kurkumin, kolorektal kanser hücre hattında, tümör baskılayıcı geni stabilize etme etkisiyle de bilinmektedir (Yang ve ark., 2002). Günlük tüketimimizde yer alan ürünlerden biri de epigallocatechin gallate (EGCG) içeren yeşil çaydır. Bu fitokimyasalın, kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesinde, DNA sentezinin engellenmesinde (Şekil 2.4) ve bu hücrelerin farklılaşmasında olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Shanafelt ve ark., 2009; Yang ve ark., 2002). Çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan luteolin, tümörün ilerlemesini ve metastazı durdurma potansiyeline sahiptir (Butterfield ve Keller 2012).



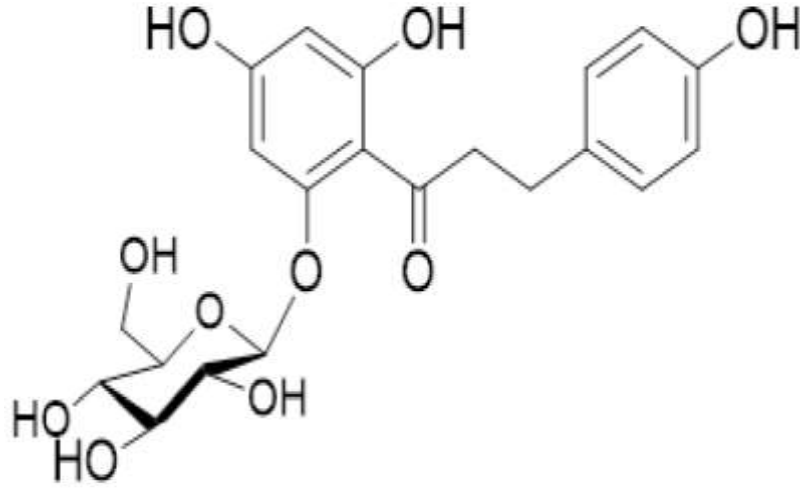
Şekil 2.4. Farklı kanser evrelerinde fenolik bileşiklerin potansiyel koruyucu mekanizmaları (Vejarano ve ark., 2019)

Yukarıdaki mekanizmalara ek olarak, polifenoller ve fitokimyasallar, hormonal sistemlerin aktivasyonu yoluyla da kanser sürecini etkilemektedirler. Östrojenler, kadın özelliklerinin gelişimine katılan steroid hormonları içeren bir kategoridir. Bu fitoöstrojenik bileşikler bir laboratuvarında üretilip ilaç şeklinde alınabilir; ancak, aynı zamanda soya ürünleri ve baklagilleri tüketerek de elde edilirler. Bu bileşikler, östrojen reseptörü ile zayıf bir bağ kurarak östrojenlerin bloke edilmesinde rol alırlar (Hecht ve ark., 2004). Benzer şekilde, fitoöstrojenik ürünler, steroid metabolizmasında yer alan bir enzim olan 5 alfa redüktaz aracılığıyla endojen testosteron seviyelerini düşürerek erkekler üzerinde olumlu bir etki yaratırlar. Fitoöstrojenik bileşikler bakımından zengin yiyeceklerle beslenen erkeklerin prostat kanseri gelişme riskinin daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Boyapati ve ark., 2005).

2.2. Floridzin

2.2.1. Floridzin tarihçesi

Floridzin (glukoz, 1- [2- (beta.D - glukopiranosiloksi) -4,6 - dihidroksifenil] -3- (4 - hidroksifenil) -1 - propanon) veya “Floridzin” (Phl), dihidrokalone ailesine ait bir flavonoiddir. 1887'de, Kimyasallar Ansiklopedisi olarak da bilinen Merck İndeksi, Floridzin'i elma ağacının kabuğundan türetilen bir glukozit olarak tanımlamıştır (Merck, 1885; Blicklé, 2014). Floridzin, bir glikoz kısmı ve bir alkil ayırıcı ile birleştirilmiş iki aromatik halkadan oluşmaktadır (Şekil 2.5). Phl ile ilgili çalışmalar, bazı Fransız kimyagerlerin elma kabuğundan Phl'yi izole ettiği 1835 yılına kadar uzanmaktadır (Petersen, 1835). Araştırmacılar, Phl'nin acı tadının, sıtmayı tedavi etmek için kullanılan söğütler veya köpek ağacı gibi diğer ilaçlara benzediğini keşfetmiş ve Phl'nin grip tedavisi için bir ateş düşürücü bileşim olarak uygun olduğu sonucuna varmıştır (de Koninck, 1836). Daha sonra yapılan bir araştırmada, 1886'da vonMering, 1,0 g'dan daha büyük dozlarda alınan Phl'nin glikozüriye (vonMering) neden olduğunu kesin olarak açıklamıştır. Glikozüri, idrarla yüksek miktarda şeker atılmasına neden olan böbrek hastalığıdır (Flint, 1886). İlk olarak, daha önce Phl enjekte edilmiş köpeklerde yapılan bir çalışmada, glikozürinin böbrekler tarafından üretildiği gözlemlendi. İyi işleyen bir böbrekte, böbrekler tarafından filtrelenen plazma glikozu yeniden emilir. Phl'nin sodyuma bağımlı glikoz taşıyıcılarını (SGLT'ler) inhibe ettiği belirlenmiştir. SGLT'ler, bağırsaktaki glikoz emilimini bloke ederek ve glikozüriye yol açarak etki eder. Sonuç olarak, Phl'nin plazma glukoz emilimini durdurma yeteneği, insanlarda diyabet tedavisi için bir başlangıç noktası olmuştur (Stiles ve Lusk, 1903). Ayrıca, Phl'nin insanlarda intravenöz kullanımı LeVeen tarafından gösterilmiştir: bu isim, tümör hücreleri tarafından glikoz alımını bloke ederek hareket eden Phl'nin bu özelliğinden yararlanarak, Phl malign hastalıkların tedavisinde kullanmıştır (LeVeen H ve ark., 1989).



Şekil 2.5. Floridzin'in yapısı (Tian ve ark., 2021)

2.2.2. Floridzin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

$C_{21}H_{24}O_{10}$ moleküler formülüne sahip Floridzin, 436,4 g / mol moleküler ağırlığa sahiptir. Zayıf bir temel bileşen olarak sınıflandırılır ve acı bir tada sahiptir. Oda sıcaklığında, Phl açık sarı toz formundadır. Phl, ılık suda veya % 100 etanolde çözünmektedir. Erime noktası 110° C'dir.

Floridzin'in Özellikleri			
Kimyasal ad:	Floridzin	Erime noktası:	113-114 °C
CB Numarası:	CB0331801	Kaynama noktası:	468.89 °C
Moleküler formül:	$C_{21}H_{24}O_{10}$	Yoğunluk:	1.3178
Formül ağırlığı:	436.41	Depolama sıcaklığı:	2-8 °C
MOL Dosyası:	60-81-1.mol	pka:	7.15± 0.40

Çizelge 2.1. Floridzin'in özellikleri

Phl, elma ağaçlarında, özellikle kök, sap, tohum gibi kısımlarda ve meyvenin kabuğunda yaygın olarak bulunmaktadır. *Compositae*, *leguminosae*, *fabaceae*, *ericaceae*, *lilliaceae* (ChemicalBook, 2017) gibi bitkilerde de düşük miktarlarda bulunmaktadır.

2.2.3. Floridzin ekstraksiyonu ve eldesi

Floridzin ekstrakte etme yöntemi açısından, diğer fenolik bileşiklerle benzer özelliklere benzerliklere sahiptir. Phl, metanol kullanılarak elmadan ekstrakte edilmektedir. Elmalardan Phl ekstraksiyonu yüzey tepkisi metodolojisine dayanır ve metanol kullanımını durumunda daha yüksek bir miktar elde edilmektedir (Alberti ve ark., 2014). Sonrasında Zhang, Phl'yi ultrasonikasyon yönteminde suyla çıkarmanın oldukça verimli olduğunu kanıtlamıştır. Sonuç olarak, safsızlıklar ortadan kaldırıldı ve daha düşük bir etanol tüketimiyle ekstraksiyon tamamlanır (Zhang ve ark., 2017). Phl eldesi için başka bir yöntem de maserasyondur. Örnek bir proseste ilk olarak kurutulmuş elma yaprakları ve dalları toz haline getirilerek %70'lik metanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmaktadır. Ardından, ekstraktın toplam ağırlığının %0,2'si kadar bir ağırlığa sahip antioksidan (C vitamini) ilave edilmektedir. Daha sonra polimerizasyondaki safsızlıklar alüminyum eklenerek giderilmektedir.

Günümüzde, Phl ekstraksiyonu (Şekil 2.6) yüksek hızlı ters akım kromatografisi (HSCCC) ile yapılmaktadır. Öte yandan reçine emici teknoloji de kullanılmaktadır. Fromm, bu yöntemin Phl'yi saflaştırmada ve tohumların kendilerini zenginleştirmede oldukça etkili olduğuna işaret etti (Fromm ve ark., 2012). Malzemenin ayrıştırılması ve saflaştırılması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri kullanılmaktadır. Yöntem ile ince tabaka kromatografisi (TLC) ile işbirliği içinde HPLC aracılığıyla, *Lithocarpus polystachyus* ekstresinden %99,87 saflıkta Phl belirlemek mümkün oldu (Dong ve ark., 2007). Liang tarafından yapılan bir araştırmaya göre, HSCCC-HPCL-diyot dizili dedektör-kütle spektrometresinin karmaşık yönteminin, daha hızlı, daha basit koşullarda gerçekleştirilen bir yöntem olduğu ve Phl'nin Malus'un yapraklarından elde edilen saflığının doumeri ağacı (% 99'un) üzerine çıktığını görülmüştür (Liang ve ark., 2015).

Elma dalları veya yaprakları	İri toz halinde ufalanmış.
Ufalanmış toz	Altı kez %70 metanol, 1 saat geri akışla ekstraksiyon, üç kez ekstraksiyon.
Çözümün özü	60 °C düşük basınçta alkolstiz konsantre olmak için %0,2 antioksidanlar ekleyin.
Konsantre sıvı	%0,5 poliamonyum klorür eklenir ve kalsiyum hidroksit solüsyonu ile pH değeri 7,5'e ayarlanır, 60 °C dkk bekletilebilir ve süzülür.
Filtrat	Etil asetatla ekstrakte edin.
Ekstraksiyon sıvısı	60 °C neredeyse kuruluğa kadar konsantre olun.
Konsantre sıvı	Yeniden kristalleştirmek için %40 metanol içinde çözülür.
Floridzin	

Şekil 2.6. Floridzin ekstraksiyonu basamaklarını gösteren örnek bir süreç (Chemical Book, 2017)

Diğer yandan, Phl sentetik olarak da elde edilebilmektedir. Phl sentezinde Malonyl-CoA ve p-coumaroil-CoA maddeleri kullanılmaktadır. Başlangıçta, p-kumaroil-CoA'nın hidroksi dihidrokinamoyl-CoA'ya dönüşümü NADPH aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tekaton sentetaz etkisi altında dihidroksi hidrokinamoyl-CoA'nın Malonyl-CoA ile sentezinden Floretin elde edilmektedir. Son olarak, Floretin'in glikolizisonucu son ürün olan Phl oluşmaktadır (Gosch ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2017; Tian ve ark., 2021).

2.2.4. Floridzin'in antidiyabetik etki

Floridzin, diyabetik farelerde kan hiperglisemisini düşürmektedir. Glikoz taşıyıcıları (SGLT) aracılığıyla Phl, bağırsak glikoz alımını ve yeniden emilimini inhibe ederek etki etmektedir (Boccia ve ark., 1999; Burceli ve ark., 1998; Yamaguchi ve ark., 2011).

Masumoto ve ark. (2009) göre, diyet Phl anormal glikoz seviyelerini iyileştirmekte, böylece diyabetik sıçanlarda ince bağırsakta SGLT1, sitokrom PP450 2b10 (Cyp2b10) ve hidrolize epoksit 1 (Eohx1)'in doğru üretimini düzenlemektedir. Başka bir araştırmacı grubu, Osorio ve ark. (2010), Phl ile yapılan bir tedavinin, hiperglisemiye azaltmanın yanı sıra hipertansiyonun normalleşmesine etki ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca, Floridzin SGLT2'nin aktivitesini de inhibe etmekte, ancak mesane membranındaki ekspresyonunu değiştirmemektedir. Kobori ve ark. (2012), Phl ile sürekli tedavinin, glikoz seviyelerini düzenlemenin yanı sıra, sitrat döngüsü, glukoneojenez, yağ asidi metabolizması ve amino asit metabolizması gibi süreçlerden sorumlu olan hepatik genlerin ekspresyonlarını da azalttığını göstermiştir.

Phl açısından zengin olan olgunlaşmamış elma diyeti, diyabetli hastalarda glisemiye düşürmüş, genel sağlık durumlarında bir iyileşme sağlamıştır (Mkarova ve ark., 2015). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasında değişikliklere ve diyabetik farelerin normalleştirilmiş tip II diyabet serumunda lipopolisakkarit azalmasına neden olmuştur (Mei ve ark., 2016).

Phl'nin hiperglisemik etkileri halihazırda bilinmektedir, ancak Phl içeren ilaçlarla uygun bir tedavi günümüzde yoktur. Bunun nedeni, zayıf bağırsak emilimi, hızlı bozunma ve düşük biyoyararlanım sebebiyle Phl kullanımıyla ilgili hala çekinceler olmasıdır (Ehrenkranz ve ark., 2005).

2.2.5. Floridzin'in antioksidan aktivite

Floridzin'in antioksidan etkisi, Lei ve ark. (2021) tarafından "Floridzin doğal bir antioksidan görevi görür, serbest radikalleri yok eder, lipidperoksidasyonunu engeller, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır ve oksidatif stresi önler" şeklinde ifade edilmiştir. Phl, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumunu önleyen bir mekanizma oluşturarak antioksidan etki göstermektedir. AGE'ler, şekerle temas eden proteinler veya lipidlerdir ve bu nedenle nöronalinflamasyonda iyileşmeye neden olmaktadır (Zielinska ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada, sıçan karaciğerinin hepatositmi kromozomlarında lipid peroksidasyonunun Phl tarafından engellendiği bulunmuştur (Rezk ve ark., 2002).

Floridzin, lipid peroksidasyonunu engelleyen güçlü bir antioksidan olarak, peroksil radikallerinin doymamış yağ asitlerinden kaynaklanan oksidasyonu önleme etkisine sahiptir (Rupasinghe ve ark., 2010). Elma kabuğundan izole edilen Phl, *in vitro* düşük yoğunluklu insan kolesterolünün (LDL) oksidasyonunu inhibe etmiştir (Thilakarathna ve ark., 2013). Ana bileşen Phl olan Tea E Se, oksidatif stres kökenli hasarı önlemiş ve H₂O₂ kaynaklı apoptozu azaltmıştır. Yapılan tüm çalışmalarının bir sonucu olarak, Wang ve ark. (2019), elmadan elde edilen Phl'nin insanların yaşamını uzattığını, organizmanın stabilitesini artırdığını, H₂O₂ 'nin neden olduğu ölüm oranını düşürdüğünü ve meyve sineklerinde antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığını vurgulamıştır. Chai ve ark. (2016), bu özelliklere dayanarak, Phl'nin ciltteki kök hücreleri etkilediğini ve bazal membranın tip IV kollajen sentezine neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Phl'nin antioksidan etkisine dayanarak güneş ışığının neden olduğu DNA hasarını onarabilen bir krem formunda sunulması ilgi gören bir durumdur (Ehrenkranz, 2006; Baldisserotto, 2012).

2.2.6. Floridzin'in anti-kanser aktivite

Floridzin, kanser önleyici özellikleri nedeniyle zaten bilinmekte ve kullanılmaktadır ve doğrudan veya dolaylı olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Qin ve ark. (2015), elma çiçeği yapraklarında bulunan Phl'nin dört tümör hücre hattına karşı test edildiğini bildirmiştir. Sadece Phl'nin değil türevlerinin de kansere karşı güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğunu açıklamıştır.

Phl'in glikoz geri emilimini önleme yeteneği, antikanser özellikleri için daha fazla araştırılabileceğini göstermektedir. Ancak, Phl'in düşük biyoyararlanımı nedeniyle şimdiye kadar yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (Crespy ve ark., 2001). Nelson ve Falk (1993b), hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda, Phl'in sıçan meme adenokarsinomuna ve mesane karsinomu hücrelerine glikoz taşınmasını engellediğini belirtmiştir. Ayrıca, Phl'in meme adenokarsinomu ve mesane karsinomu implante

edilmiş farelerde tümör hücresi büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Nelson ve Falk, 1993a).

Başka bir çalışma, Phl'in türevleriyle birlikte bazı insan hücre hatları (A549 akciğer karsinomu, HepG2 hepatoselüler karsinomu, Bel-7402 hepatoselüler karsinomu ve HT-29 kolon karsinomu) üzerinde bir antitümör etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Qin ve ark., 2015). Bununla birlikte, diğer türevleri ile karşılaştırıldığında, Phl, bileşiminde glikozit bulunması nedeniyle daha düşük bir anti-kanser etki sergilemiştir. Glikozit varlığı, daha zayıf bir geçirgenlikle ilişkilidir (Wu ve ark., 2007).

Bazı çalışmalarda Phl türevi farklı kimyasallar da kullanılmıştır. Phl yağ ester asitleri, altı mono ve çoklu doymamış yağ asidi ile Floridzin enzimatik olarak toplanmasıyla laboratuvarında sentezlenmiştir. Bu Phl ester yağ asitleri şunlardır: (Phl-oleik asit), (Phl-stearik asit), (Phl-linoleik asit), (Phl-dokosaheksanoik asit), (Phl-ekosapentanoik asit). Bu bileşiklerin, meme adeno karsinomu, hepatosellüler karsinom ve lösemi gibi kanser türlerinde antikanser aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu etki, aralarında bir etkileşim olduğunda, ayrı ayrı alınan Floridzin moleküllerinden veya türevlerinden daha güçlüdür (Cardile ve ark., 2005). Benzer şekilde, Nair ve Rupasinghe (2014) ise çalışmalarında Floridzinin yağ asidi esterlerinin, HepG2 hücrelerinde, G0/G1 faz tutuklamasını indüklediğini, DNA topoizomeraza IIa aktivitesini inhibe ettiğini, kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediğini ve ATP seviyesi ve mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğü sonucuna varmışlardır.

2.2.7. Floridzin'in genotoksik ve anti-genotoksik etkileri

Floridzin'in anti-genotoksik özellikleri ile bilindiği zaten doğrulanmış olsa da, bu konuda çok az çalışma yapılmıştır. Bu nedenle aşağıda kısa bir özet Phl'nin anti-genotoksik potansiyeline ilişkin verileri sunmaktadır. Önceki *in vitro* çalışmalar, Phl de dahil olmak üzere elmadaki polifenolik bileşiklerin genotoksisiteyi azalttığını göstermiştir.

Bir çalışmada amaç, Phl'in Parkinson hastalığının (PD) hücresel modeli üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla rotenona maruz bırakılan nöron benzeri SH-

SY5Y hücreleri incelenmiştir (Imamura ve ark., 2006; Borland ve ark., 2008; Giordano ve ark., 2012). Rotenon varlığına maruz kalan hücrelerin genetik materyal hasarında artış, ROS üretimi, apoptotik ve nekrotik hücre hasarı ve kaspaz-3 aktivasyonunda artış olduğu bulunmuştur (Panov ve ark., 2005; Rezk ve ark., 2002). Floridzin'in rotenon ile uyarılan hücreler üzerindeki faydalı etkileri Komet testi ile değerlendirilmiştir. Rotenone ile muamele edilen hücrelerde anlamlı DNA hasarına rastlanmıştır. Bununla birlikte, Phl'in mikromolar konsantrasyonlardaki etkisi, rotenona maruz kalan hücrelerin ölümünde bir azalmaya neden olmuştur. Bu deneysel koşullarda, Phl DNA hasarını inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, Phl 'in varlığı, rotenon ile tedavi edilen hücrelerde oluşan genotoksik DNA hasarının önüne geçip hücre ölümüne aktif olarak karşı koymaktadır (Barreca ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada, kolon kanserinin HT29 hücreleri, Phl de dahil olmak üzere elma özleri (AE) ile tedavi edilmiştir (Veeriah ve ark., 2006). Phl ile tedavi, birçok genin (örneğin, GSTP1) modülasyonu ile sonuçlandı. GST maddeleri (enzimler), indüklenmiş GSTP1'in bir sonucu olarak genotoksisitelerini kaybederler (Ebert ve ark., 2001; Ebert ve ark., 2003).

2.2.8. Floridzin'in anti-inflamatuar etkiler

Shin ve ark. (2016), Floridzin'nin diyet uygulanan obez farelerde iltihaplanma düzeyini azaltabildiğini bildirmiştir. Ayrıca Phl metabolitlerinin nitrik oksit (NO) üretimini azalttığı da tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2017).

Shin ve ark. (2016), Phl'in anti-inflamatuar potansiyelini belirleyerek Phl'nin diyet uygulanan obez farelerde inflamasyonu azaltabildiğini göstermiştir. Ayrıca, Phl ultraviyole B (UVB) tarafından indüklenen proinflamatuvar sitokinlerin aktivitelerini baskılayabilmektedir. Buna bağlı olarak, UVB'ye maruz kalan bir ciltteki akut inflamasyonun Phl varlığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Zhai ve ark., 2015). Yüksek miktarda yağ enjekte edilen farelerde Phl, proinflamatuvar serum sitokinlerini ve yağ dokusu inflamasyonunu etkileyerek sitokin seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür (Tian ve ark., 2017).

Dekosaheksanoik asit (DHA), atimik farelerde yapılan bir çalışma olan kolon kanserinin ana inhibitörüdür (Kato ve ark., 2002). DHA, bazı ajanların etkinliğini sinerjistik biçimde artırdığı için kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır (Siddiqui ve ark., 2011). Phl-DHA konjugatı, reseptörler ve inhibitörler arasında daha seçici bir hedefleme nedeniyle daha büyük bir etkinlik potansiyeline sahiptir (Faivre ve ark., 2006). Sonuç olarak, Phl'nin bir antioksidan ve anti-inflamatuar ajan gibi davrandığı (Hale ve ark., 2008; Wybranowski ve ark., 2014) ve normal hücreler üzerindeki sitoprotektif etkilerini açıklayabileceği zaten açıktır (Pietta, 2000). Bu bulgular, bu ürünün yutulmasının gıda olarak besin değerine ek olarak antiproliferatif ve nutrasötik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Aguñiga-Sánchez ve ark., 2013).

2.2.9. Floridzin'in hepatoprotektif etkiler

Dalak, vücuttaki toksinleri temizlemenin yanı sıra hormonal düzenleme ve denge ile ilgilenen en büyük iç organdır. Metotreksattan kaynaklanan karaciğer hasarı sonucunda Phl'in olası koruyucu etkileri keşfedilmiştir. Phl, hepatoksisiteye karşı oksidatif stresin ve karaciğer dokularında inflamasyonun azaltılması ve apoptoz mekanizmaları aracılığıyla etki eder (Khalifa ve ark., 2017). Phl'nin CCl₄'ün neden olduğu hepatik fibrosis hepatoprotektif etkileri olduğu, hepatosit membranlarını hasardan koruduğu ve fibrozu azalttığı keşfedilmiştir (Deng ve ark., 2012).

Ek olarak, Phl vücut ağırlığında kayba, toplam kolesterol (TC) ve kan trigliseridlerinde (TG) düşüşe neden olmuştur. Ayrıca, tip II diyabetik farelerin karaciğer hasarını da inhibe etmiştir (Lu ve ark., 2012).

Phl bakımından zengin sulu meyve özütlerinin kombinasyonunun değerlendirilmesi, normal İsviçre albino fareleri için hepatik ve renal glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve ayrıca katalaz ve glutatyon (GSH) aktivitesinin düzenlenmesi için pozitif bir başlangıç noktasıdır (Illam ve ark. 2019). Elmadan izole edilen Phl, DNA hasarı, apoptoz ve oksidatif stresi iyileştirmiş ve hücre canlılığını artırmıştır (Wang ve ark., 2019). Aynı zamanda, Phl etkisiyle karaciğer, glisemik

aktiviteyi ve hepatik glikoz inhibisyonunu izleyerek de iyileştirilebilir (David-Silva ve ark. 2020).

2.2.10. Floridzin'in kardiyoprotektif etki

Çalışmalar Floridzin'in kalbi belirli hastalıklardan korumada oldukça etkili olduğunu ileri sürmektedir. Yüksek miktarda Phl içeren soya tohum katmanları, THP-1'in insan göbek kordonu endotel hücrelerine yapışmasını inhibe etmiştir. Bu, Phl'nin koroner kalp hastalığını önlemede potansiyel bir faktör olduğunu göstermektedir (Lee ve ark., 2017). Aynı zamanda, kardiyak lipid aktivitesi ve mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde etkili olduğu tanımlanan proteinlerin ifadesinin Phl tarafından düzenlenmesi, bu molekülün diyabetik kardiyomyopatinin gelişimini engelleyebileceğini göstermektedir (Cai ve ark., 2013).

2.2.11. Floridzin'in antibakteriyel etki

Literatür, Floridzin'in bakteri ve mantarların tedavisinde etkili olduğunu göstermektedir. Daha spesifik olarak, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*'in inhibisyonu, *Malus domestica* yaprak özütlerinden elde edilen Phl'nin antifungal ve antibakteriyel aktivitesi ile açıklamıştır (Sowa ve ark., 2016). Ayrıca, mikotoksijenik mantarların büyümeleri ,antifungal aktivite özelliği ile bilinen elma posası özleri ile temas ettirilerek engellenmiştir (Oleszek ve ark., 2019).

2.2.12. Floridzin'in kemiklerdeki etkisi

Floridzin'in diğer aktivitelerinden biri de kemiklerin durumunu *in vivo* iyileştirme kabiliyetidir. Kemiklerin büyük ölçüde etkilendiği osteoporoz sürecinde, Phl'nin koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (Puel ve ark., 2005). Ayrıca Phl ve öncüsü Floretin'in osteoblastojenik kemik oluşumunu teşvik etme işlevine sahip olduğu da bulunmuştur (Antika ve ark., 2017).

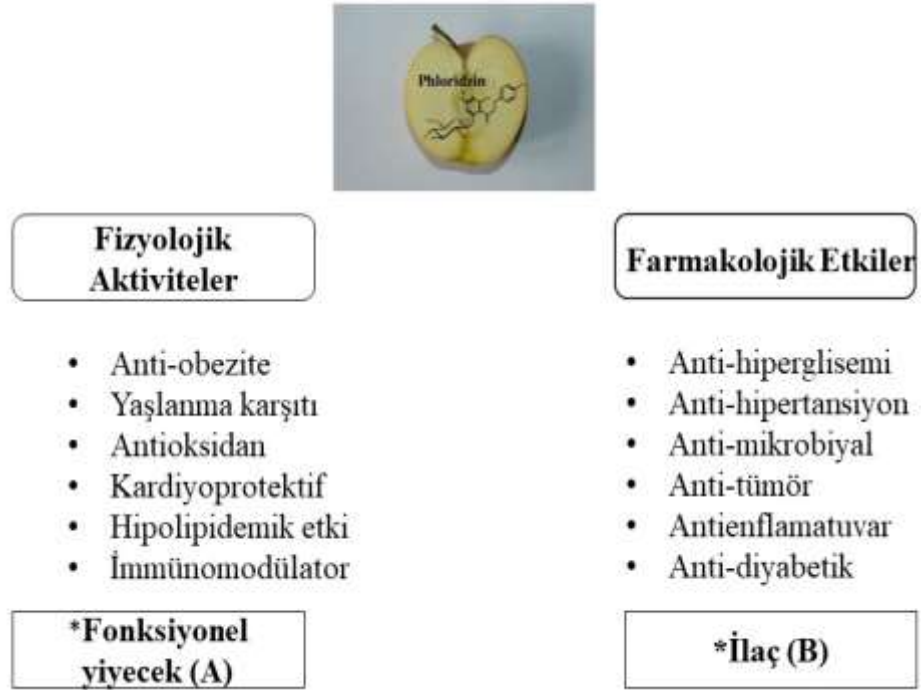
2.2.13. Floridzin'in toksik etkileri

Floridzin'in olumlu etkilerinin yanı sıra olumsuz etkileri de vardır. Phl'nin hangi sınırlar içinde normal bir etkiye sahip olduğu ve hangi durumlarda sağlık için güvenli olmayan bir madde olarak görüldüğü henüz net değildir. Bir yandan şeker hastalarının iyileşmesine etki ederken, kan şekeri seviyelerinde ciddi bir düşüşe de yol açabilir. Ayrıca, Phl maruziyetinin temel sonucu olan glukozüri kendi başına toksik bir etkidir. Bununla birlikte, Phl'in de renal hipertrofiye neden olabileceği gösterilmiştir (Singleton ve Kratzer, 1969).

Phl bitkisel bir ürün olmasına rağmen, tüketimi kontrollü olmalıdır. Phl ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen organizma ve hastalık için gerekli olan uygun dozlar henüz belirlenememiştir. Dozlar bireyin yaşına, sağlığına göre belirlenir ve bu nedenle her zaman uzmanlara danışılması önerilmektedir (Crespy ve ark., 2001; Bradford ve Allen, 2007).

2.2.14. Floridzin'in diğer fonksiyonları

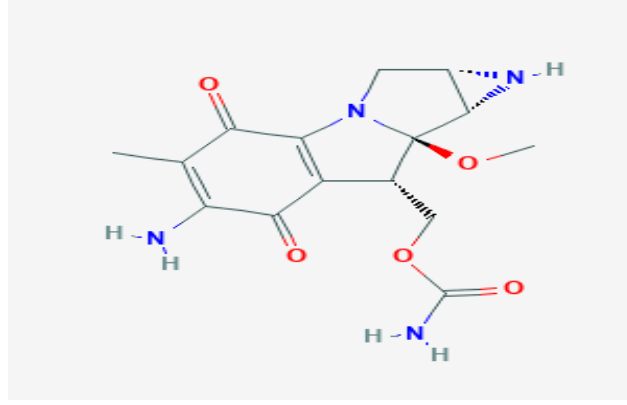
Yukarıda belirtilen işlevlere ek olarak, Floridzin başka biyolojik etki ile bilinir. Genistein, kan şekerinin normalleşmesini etkileyen, menopoz semptomlarını azaltan, prostat ilerlemesi ve hatta meme kanseri olasılığını azaltan bir bileşiktir. Andlauer ve ark. (2004) göre Phl, genisteinin farelerin ince bağırsağında daha verimli emilmesini sağlamıştır. Phl'nin etkisi altında, tirozinaz transkripsiyonel aktivite sürecini melanogenezin başlangıcı takip etmektedir (Jung ve ark., 2009). Bir başka açıdan, Phl, süperoksit dismutaz (SOD) ve SIRT1'in (Xiang ve ark., 2011) artan aktivitesi yoluyla yaşlanmayı yavaşlatarak insan vücudunu etkilemektedir. Phl ile etkileşim halindeki MAPK sinyal yolu, farelerde polikistik böbrek hastalığının gelişimini engelleyebilmektedir (Wang ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, Phl, stres yüklü farelerin plazmasındaki lipoproteinlipaz aktivitesini artırmada etkili olmuştur (Wang ve ark., 2014). İçeriğinde Phl bulunan *Malus baccata* meyve ekstraktlarının radyoprotektif ve immüno modülatör koruyucu etkilere sahip olduğu açıklanmıştır (Wang ve ark., 2016).



Şekil 2.7. Floridzin'in potansiyel uygulamaları ve daha fazla kullanımı: A) gıdada aktif bir bileşik olarak ve B) aktif bir farmasötik bileşen olarak (Tian ve ark., 2021)

2.3. Mitomisin C

Mitomisin C, açık formülü ile [6-Amino-8a-methoxy-5-methyl-4,7-dioxo-1,1a,2,4,7,8,8a,8b-octahydroazireno[2',3':3,4]pyrrolo[1,2-a]indol-8-yl]methylcarbamate, 1950'den beri bilinen antitümör özelliklere sahip bir antibiyotiktir. Japonlar tarafından keşfedilmiş ve *Streptomyces caespitosus* mikroorganizmasının fermantasyon kültürlerinde izole edilmiştir (Szybalski ve Iyer, 1964). Mitomisinlerin birkaç çeşidi zaten bilinmektedir, ancak en önemlisi Mitomisin C'dir (MMC). MMC'nin DNA sentezini, mutagenezini inhibe etmede, genetik rekombinasyonu, kromozom ayrılmasını ve DNA rekonstrüksiyonunu uyarmada spesifik bir etkisi vardır. MMC, RNA ve protein sentezini yüksek konsantrasyonlarda durdurur ve özellikle hipoksik hücrelere karşı daha fazla toksik aktivite sergiler (Sinawe ve Casadesus, 2020). Şimdi, MMC çeşitli klinik tedavilerde önemli bir antitümör potansiyeli olarak kabul edilmektedir (Szybalski ve Iyer, 1964). İlk olarak mide ve pankreas metastazlarının tedavisi için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Verweij ve Pinedo, 1990).



Şekil 2.8. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, 2021)

C₁₅H₁₈N₄O₅ moleküler formülüne sahip MMC, mavi-mor kristal şeklinde olarak görünmektedir. Normal şartlar altında toz haldedir. Molekül ağırlığı 334,33 g/mol'dür (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, 2021). Kaynama noktası 534 °C'dir. Su, metanol, butil asetat, aseton ve sikloheksanonda çözünebilen bir maddedir. Öte yandan benzen veya eterde az çözünür (Sinawe ve Casadesus, 2020). Işıktan korunduğunda, buzdolabında 0 °C'de yedi güne kadar saklanabilir.

Enjeksiyondan sonra, MMC'nin kan dolaşımından hızla kaybolduğu gösterilmiştir. Araştırmalara göre, ilaç tüm vücutta yaygın olarak dağılabilirken beyinde tespit edilememiştir (Gilman ve ark., 1990).

Böbrekler, memelilerde en yüksek MMC konsantrasyonuna sahiptir, bunu kaslar, gözler, akciğerler, bağırsaklar ve mide izlemektedir. İlaç, hızla inaktive olduğu karaciğer, dalak veya beyinde saptanamamakta, kanser dokularında normal dokulara göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (McEvoy, 1990).

MMC plazmadan temizlenir ve 8-48 dakika arasında değişen bir yarı-ömre sahiptir (Gilman ve ark., 1990).

Mitomisin C intravenöz ve intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. İlaçların deri altından veya kas içinden verilmesi önerilmemektedir. Artmış ekstrevasiyon riski nedeniyle intravenöz infüzyonların yakından izlenmesi önerilmektedir.

2.3.1. Mitomisin C'nin anti-kanser etki mekanizmaları

Mitomisin C, DNA sentezini engelleyen bir antibiyotiktir. MMC, birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin, MMC, mide ve pankreas adenokarsinomu için diğer ilaçlarla kombinasyon halinde ve ayrıca anal, mesane, meme, servikal, kolorektal, baş ve boyun ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinin palyatif tedavisinde kullanılmaktadır (Sasaki ve ark., 2006). MMC ayrıca, glokom cerrahisinde, dokularda aşırı sıvı birikmesini önlemek amacıyla da kullanılmaktadır (Cabourne ve ark., 2015).

MMC, DNA zincirinde değişikliklere ve dolayısıyla kromozomal hasara neden olduğundan önemli bir karsinojen ve teratojen olarak sınıflandırılmaktadır (Teus ve ark., 2009). MMC, DNA'ya kovalent olarak bağlanabilen ve zincirler arası çapraz bağları indükleyebilen bir alkilleyici ajan olarak işlev görür (Roh ve ark., 2008); ancak bu etki mekanizmalarından birincisi daha baskındır (Avendaño ve Menéndez, 2015). Alkilleyici ajanlar veya çapraz bağlayıcılarla tedavi, hücre döngüsünün ilerlemesini ve devamında çift zincir kırıklarının (DSB) oluşumunu ve γ H2AX ekspresyonu için S fazından geçmeyi gerektirir (Banáth ve ark., 2010). DSB, çapraz bağlı bir DNA veya hasarlı DNA bazının, bir replikasyon çatalıyla karşılaştığında ortaya çıkar (Limoli ve ark., 2002). Nitekim Al-Minawi et al. (2009), MMC ile indüklenen DSB'nin, zincirler arası çapraz bağda durmuş replikasyon çatallarının çökmesinin bir sonucu olduğunu bildirmiş, MMC ile indüklenen DSB'nin, replikasyonun durdurulmasıyla önlendiğini göstermiştir. MMC, DNA'ya çapraz bağlar (iplik içi ve sarmallar arası çapraz bağlar), alkilasyon ve serbest radikallerle DNA zinciri kırılması yoluyla antineoplastik aktiviteye sahip bir dizi aktif moleküle metabolize edilir (Ray, 2014). MMC'nin metabolizasyonu ile birlikte aktive edilmesinde kinon yapısının indirgenmesi ilk adımdır. Sitokrom P-450 redüktaz, ksantinoksidaz, sitokrom b5 redüktaz ve diğer enzimler, bir elektron indirgenme reaksiyonuna aracılık ederken, DT-diaforaz, ksantindehidrogenaz ve diğer enzimler bir elektron çifti indirgeme reaksiyonuna aracılık eder (Ray, 2014).

MMC, bazı olumsuz etkilere de sahiptir. MMC'nin moleküler ağırlığı yüksektir ve hidrofobik olmasından dolayı daha sistemik absorpsiyonu düşüktür. MMC

kemoterapisinin, düşük ve orta riskli tümörlerde tümör nüks oranını düşürmede hala faydalı olduğu düşünülmektedir (Volpe ve ark., 2010).

Endotel hücrelerinde MMC kaynaklı DNA alkilasyonu, genotoksik strese yol açar. Başka bir çalışmada, HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells) ve HITAEC (Human Internal Thoracic Artery Endothelial Cells) hücrelerinde MMC ile indüklenen DNA alkilasyonu incelenmiştir. MMC ile tedavi edilen endotelial hücreler, kontrol hücrelerine kıyasla sitogenetik hasarda bir artışa sahipti (Sinitsky ve ark., 2020).

Endotel hücrelerinde MMC kaynaklı DNA alkilasyonu, genotoksik strese yol açar. Başka bir çalışmada, *in vitro* olarak 500 mg/ml MMC'ye maruz bırakılan primer insan koroner arter endotel hücrelerinde (HCAEC) ve insan iç torasik arter endotel hücrelerinde (HITAEC) DNA hasarı, protein salgılanması ve IL6 ve IL8 gen ekspresyonu incelenmiştir. MMC ile tedavi edilen hücreler kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında sitogenetik hasarda bir artış oldu. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, hem HCAEC hem de HITAEC, MMC ile 6 saatlik inkübasyondan sonra IL8 konsantrasyonunda ve IL6 ve IL8 mRNA seviyelerinde bir düşüş gösterdi. Bu çalışmalar, çeşitli arterlerden kaynaklanan endotel hücrelerinde MMC'nin neden olduğu genotoksik stresin, proinflamatuvar sitokin salınımı ve gen ekspresyonundaki farklılıklarla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Sinitsky ve ark., 2020).

2.3.2. Mitomisin C'nin yan etkileri

Mitomisin C'nin en yaygın ve ciddi yan etkileri kemik iliği toksisitesidir. Zamanla miyelosupresyona neden olur. Bunun yanı sıra trombositopeni ve belki de lökopeni ilaç tedavisine başlandıktan sonraki ilk iki ay içinde her an ortaya çıkabilir (Sturm ve ark., 2012).

Sistemik MMC uygulanan hastalarda, mikro anjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve geri dönüşümsüz böbrek yetmezliği ile karakterize kemoterapinin yıkıcı bir sonucu olan hemolitik üremik sendrom (HÜS) gözlenmektedir (Salvadori ve Bertoni, 2013). Sendrom, sistemik MMC tedavisi sırasında tek başına veya diğer

sitotoksik ilaçlarla kombinasyon halinde herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Bununla birlikte, vakaların çoğu, 60 mg'a eşit veya daha büyük olan MMC dozlarında meydana gelir. Sendromun sıklığı henüz belirlenmemiştir (Drugs.com, 2020).

2.4. Genotoksik ve Karsinojenik Testler

Günümüzde, yeni ilaçların keşfedilmesi ve geliştirilmesine yönelik talep artmaktadır. Ancak en etkili ilaç ve ilaçlara sahip olmak için birçok engelin aşılması ve elbette güvenliğin maksimum düzeyde olması gerekir. Sürekli olarak yeni ilaçların keşfine duyulan ihtiyaç neticesinde ilaç endüstrisinin gelişme hızında bir artış yaşanmıştır (Gross ve Kramer, 2003).

İnsan genomu deoksiribonükleik asitten (DNA) oluşur. DNA, genetik kalıtsal materyali ebeveynlerden yavrularına taşıyan ve aktaran temel ve işlevsel birimdir (Swift ve Golsteyn, 2014). Bir molekül olarak DNA, yapısında değişikliklerin indüklenmesine duyarlıdır. Bununla birlikte, hücreler, hassas biyokimyasal yolları devreye sokarak DNA'yı kopyalayabilir, modifikasyonların varlığını tespit edebilir ve meydana gelen değişiklikleri onarabilir (Jackson ve Bartek, 2009). Bir hücrenin kaderi, tam olarak genomun potansiyeline ve onu değişmeden tutma yeteneğine bağlıdır. Hücreler, genetik materyalin değişimini önleyerek ve onu koruyarak, stabilitelelerini ve genetik materyalin bir sonraki nesle doğru bir şekilde iletilmesini sağlar (Swift ve Golsteyn, 2014).

Hücreler DNA'da hasar fark ettiğinde, hasarı önleyerek ve onararak çalışan DNA hasar yanıtını (DDR) etkinleştirirler. Yanıtı, genomda meydana gelen ve kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılmasını hızlandıran değişiklikler izler (Swift ve Golsteyn, 2014).

Çeşitli tehlikeli maddelerin genetik materyal üzerinde etkili olduğu araştırmacılar tarafından uzun bir süredir bilinen bir durumdur. Bu tür maddeler, genetik materyalin değişimini etkiler ve sonuç olarak kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Tehlikeli maddeler biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Miyamae ve ark., 1998; Engström ve ark., 2015; Sun ve ark., 2016). Genetik alanında "Genotoksisite" terimi, zararlı maddelerin genetik materyalde

değişiklik meydana getirme yeteneği olarak tanımlanır. Bu terim genellikle "mutajenik" terimiyle karıştırılabilir, ancak ikincisi, hücrelerin genetik materyalinin yapısında kalıcı bulaşıcı değişiklikler anlamına gelir ve böylece mutasyonların sıklığını artırır. Ren ve ark. (2017), "genotoksisite, mutajeniteyi içerir, ancak DNA dizilerinde genetik değişikliklere neden olmayabileceğinden, tüm genotoksik maddeler mutajenik değildir" demektedir. Genetik toksisite ya da genotoksisite, çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen hasarlar olarak tanımlanmaktadır. Genotoksisite DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite gibi hasarlardan kaynaklanmaktadır. Genotoksinler ise genetik materyalde mutasyona neden olan mutajenik maddelerdir (Mohamed ve ark., 2017).

Genotoksik değişimlerin meydana geldiği seviyeler üç kategoriye ayrılır:

- Gen düzeyinde mutajenite: Bu, genotoksik etkinin en mikroskobik seviyesidir ve DNA nükleotid dizisinde bir kodon değişikliği veya tek bir gen ya da gen segmentinde bir mutasyon ile sonuçlanan bir değişikliği kapsar.
- Klastojenite: Boşluklar, kırılmalar veya yeniden düzenlemeler gibi kromozomlarda gerçekleşen yapısal bir modifikasyondur.
- Anöjenisite: Bir veya daha fazla kromozom kazancı veya kaybı nedeniyle kromozom sayısında değişikliğe yol açan bir etkidir (Tcheremenskaia, 2019).

Genotoksisite kanserin en önemli nedenlerinden biridir. Genotoksinler, DNA veya kromozom yapısında hasara neden olarak mutasyonlara neden olabilen ajanlardır. Farklı doğa, kimyasal veya radyasyon olabilir. Somatik hücrelerdeki bu hasar kanser dahil çeşitli hastalıklara yol açabilir. Aynı zamanda eşey hücrenin zarar görmesi kalıtsal hastalıklara yol açacaktır (Şekil 2.9., Mohamed ve ark., 2017). Bu nedenle toksinlerin aktivitelerini tespit etmek, verdikleri zararı önlemek için önemlidir. Hücreler üzerindeki etkilerine göre genotoksinler şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Karsinojenler veya karsinojenlik sürecini, dolayısıyla kanser oluşumunu teşvik eden maddeler.
- Mutajenler veya genetik materyalde geri dönüşü olmayan hasara neden olan ve nesilden nesile aktarılan maddeler.

- Teratojenler, embriyonal gelişimi etkileyen ve doğuştan gelen kusurlara neden olan ajanlardır (Natarajan, 1993).

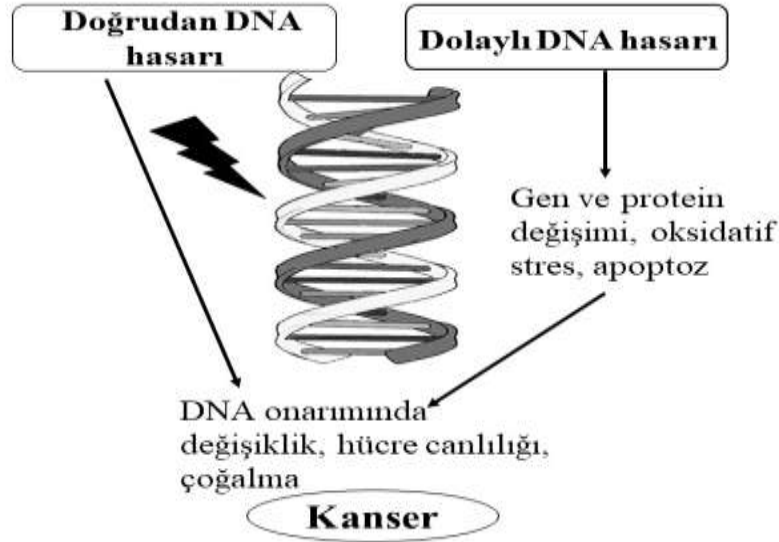
Genotoksisite testleri, Mikronükleus testi, Kromozom aberasyon testi ve Ames testi dahil olmak üzere genotoksisite ölçüm testlerinden oluşur (Muller ve ark., 1999). Testlerin sonuçlarına ve yüksek duyarlılığına rağmen, çeşitli çevresel faktörlerden etkilenmekte, bu da testlerin özgülüğünü azaltmaktadır (Kirkland ve ark., 2005). Bu nedenle, daha fazla özgülüğe sahip daha bilgilendirici *in vitro* testlerin acilen gerekli olduğu açıktır. Kanser hem genotoksik hem de genotoksik olmayan mekanizmalarla başlatılabilir (Hanahan ve Weinberg 2000, 2011). En iyi bilinen karsinojenler, genotoksik karsinojenler (GC'ler) grubuna dahil olan ve DNA'da kromozomal hasar veya mutasyona neden olanlardır (Hernandez ve ark., 2009). Ancak genotoksik olmayan karsinojenler (NGC'ler), endokrin sistemi, epigenetiği ve apoptotik süreci etkileyen daha geniş bir aktivite gösterirler (Melnick ve ark., 1996; Uehara ve ark., 2008; Williams, 2001).

Karsinojenlik testi, farmasötik, gıda ve tarım endüstrilerinde bileşik geliştirme ve güvenlik değerlendirmesinin çok önemli bir yönüdür. Bu tür testler, kısa süreli *in vitro* testleri ve kısa süreli *in vivo* testleri içerir (Kirkland ve ark., 2005). Karsinojenlerin bir sonucu olarak farklı kanser türlerinin gelişmesi halinde, bireylerin kansere kalıtım karakterleri ve kanser geliştirmeye yönelik genomik yatkınlıklarının hesap dahilinde tutulmaları gerekmektedir.

Karsinojenler farklı tiplerdedir ancak mekanizmaları iki form içerir:

1. Karsinojen, hücrelerin genetik materyali olan DNA'ya doğrudan etki ederek mutasyonlara neden olur. Bu, hücrelerin düzensiz bölünmesine ve gelişmesine yol açar.
2. Karsinojen genetik hasara neden olarak hücrelerin daha hızlı bölünmesine neden olabilir. Hücreler bölündüğünde, her zaman kanser geliştirme riskini artıran bir modifikasyon (mutasyon) olasılığı vardır (Eldridge, 2019).

İnsanlar herhangi bir zamanda ve herhangi bir yerde kanserojen maddelerden etkilenebilirler. Karsinojen maddeler, onlara maruz kalan her insanda kansere neden olmaz. Karsinojenlerin kanser gelişimini etkileme yetenekleri, maruz kalma miktarı, maruz kalma süresi, bireyin genel sağlığı ve ayrıca diğer genetik belirleyiciler gibi bir dizi faktöre bağlıdır (Amerikan Kanser Derneği, 2019).



Şekil 2.9. Genotoksisite ve kanserojenlik arasındaki ilişki (Mohamed ve ark., 2017)

Genotoksisite ve etkilerini saptamak ve belirlemek için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Bu testler, genetik materyalin değişimini etkileyen maddelerin çeşitli mekanizmalarla belirlemeyi hedeflemektedir. (Cimino, 2006). Bu testlerin sonuçları, bileşiklerin hücrelerde kanserojenlik veya genotoksisiteye neden olma potansiyeli ve kabiliyeti hakkında bilgi sağlamaktadır (Shah, 2012).

2.4.1. DNA hasarları ve genotoksisite mekanizmaları

İlaç geliştirme alanında, klastojenik ve mutajenik potansiyelin etkisini belirlemek için *in vivo* ve *in vitro* testler kullanılarak genetik toksikoloji çalışmaları yürütülmektedir (Lilly, 1965). İncelenen ilaçlar, klastojenite olarak bilinen kromozom hasarını indükleme kabiliyeti açısından değerlendirilir (Custer ve Powley, 2015). Bu klastojenik maddeler, DNA-reaktif ve DNA-reaktif olmayan olmak üzere iki mekanizma yoluyla

kromozomlarda yapısal değişiklikler yaratır (Shaw, 1970). DNA-reaktif kimyasallar, kromozomal hasarını ve bunun sıklığını artırarak çalışır. DNA ile kovalent bağ oluşturarak hareket ederler. (Benigni ve ark., 1995).

Artmış kromozomal hasara yol açabilen DNA-reaktif olmayan mekanizmalar, DNA polimeraz inhibitörü aphidicolin ile gözleendiği gibi DNA sentezini engelleyen molekülleri içerir (Carme ve ark., 1999). Etoposid gibi topoizomeraz II inhibitörleri, DNA-topoizomeraz II kompleksini stabilize ederek ve DNA çift sarmal kırıklarını neden olarak kromozomal anomaliler meydana getirirler (Galloway ve ark., 1998).

Öte yandan vücudumuzdaki hücreler, organizmayı spontan veya indüklenmiş mutasyonlardan koruyarak beden sağlığını sürdürmek üzere bir savunma oluşturabilir. Anti-mutajenler, mutasyon gerçekleşmesini engelleme yolu ile bu mutajenlerin olumsuz etkilerini azaltacak biçimde hareket ederler. Öncelikli olarak aşağıdakileri içeren iki tür anti-mutajenez yolu bulunmaktadır:

- Mutajenlerin etkinliğini ortadan kaldıran desmutagenlerin varlığı;
- Biyo-antimutajenez yolu ile de hasarlı DNA'yı tamir edilmektedir. Sonuç olarak, DNA mutasyonlarının insidansı azalır (Bushra ve Mohammed 2001).

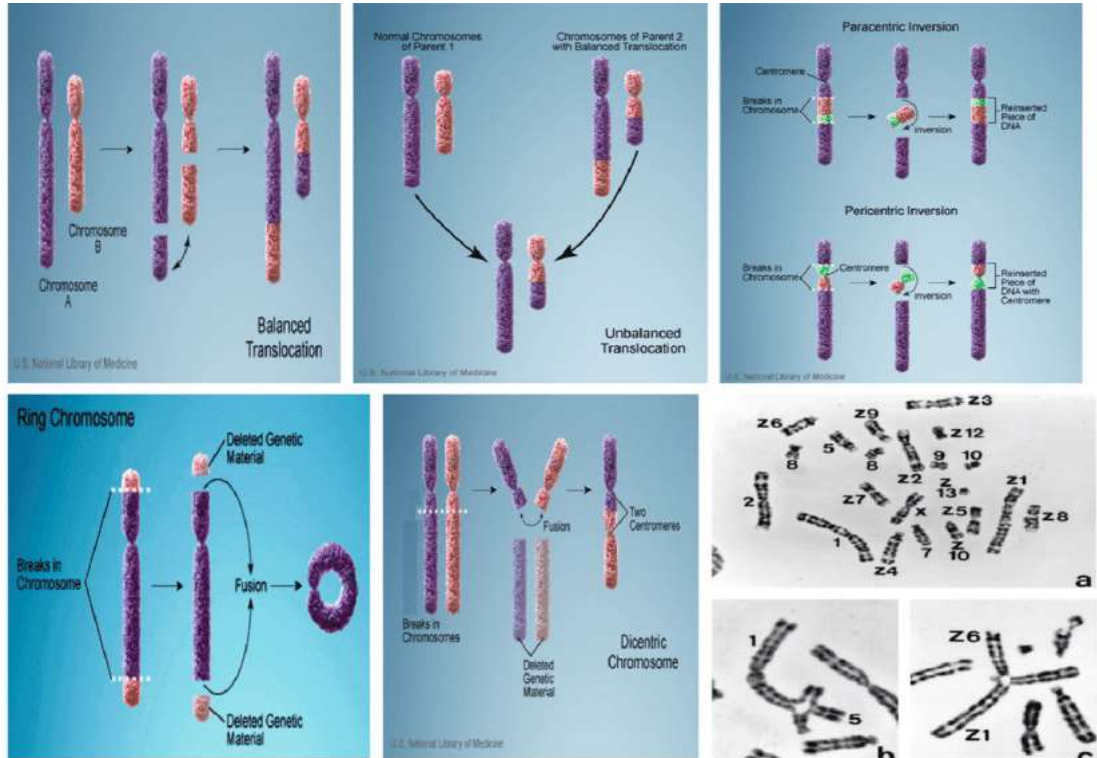
Genel olarak ise DNA rejenerasyonu ve onarımının gerçekleştirildiği beş farklı DNA tamir mekanizması mevcuttur: Doğrudan onarım, Baz eksizyon onarımı (BER), Nükleotid eksizyon onarımı (NER), Yanlış eşleşme tamiri, Tek/çift zincir kırılma onarımı (Tuteja ve Tuteja, 2001; Morgues ve ark., 2007; Bannister ve Schimenti, 2004; Tweats ve ark., 2007).

2.4.2. Kromozom aberasyon testi (CA)

Kromozomal aberasyonlar (CA'lar), kendiliğinden veya kimyasal/radyasyon tedavisinin bir sonucu olarak normal kromozom yapısında veya sayısında meydana gelebilecek değişikliklerdir. Kromozom sapma (CA) tahlili ile değerlendirildiği üzere, periferik kan lenfositlerindeki (PBL'ler) yapısal CA'lar, 30 yılı aşkın bir süredir mesleki ve çevresel ortamlarda genotoksik karsinojenlerin erken etkilerinin bir biyolojik belirteci olarak

kullanılmaktadır (Boffetta ve ark., 2007; Carrano ve Natarajan, 1988). Ayrıca kromozom aberasyon testi, ilaç keşfi açısından da yeni bir molekülün genotoksik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir parametresidir (Nigam, 2009). Kromozomal anormalliklerin sıklığının kansere yatkınlığın bir göstergesi olduğu da varsayılmıştır (Carrano ve Natarajan, 1988; Mateuca ve ark., 2006; Umbuzeiro ve ark., 2016).

Kromozom Aberasyon testi, *in vivo* ve *in vitro* olarak hücre kültürlerinde kromozomların yapısına zarar veren ajan ve maddeleri belirlemeyi amaçlamaktadır (Toropov ve ark., 2019). Yapısal aberasyonlar farklı türdedir ve şunları içerir: duplikasyon, insersiyon, delesyon, inversiyon ve translokasyon (Şekil 2.10). Genetik hastalıklar veya genotoksik maddelere maruz kalmanın bir sonucu olarak kromozom hasarının meydana geldiği artık iyi bilinmektedir. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde CA ile ilgili sonuçların kanser belirtisi olduğu kanıtlanmıştır (Ishidate ve Sofuni, 1985).

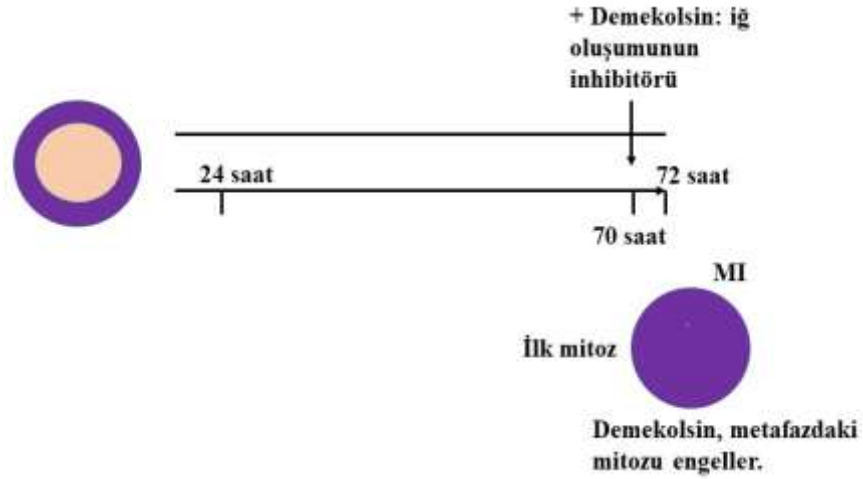


Şekil 2.10. Kromozom aberasyonları türleri (Salem, 2014)

Çift sarmallı DNA hasarı, DNA replikasyonundaki veya onarımındaki hataların bir sonucu olarak, genotoksinlerin etkisiyle doğrudan veya dolaylı biçimde oluşabilir. Dozların indüksiyonundan sonraki ilk metafaz, birçok DNA hasarının ölümcül olması veya sonraki hücre bölünmesinden sonra artık mevcut olmaması nedeniyle önemlidir. Çeşitli genotoksinlere bağlı DNA hasarlarını test etmek için uygun kültürler kullanılır. Hücre soyları çoğunlukla arzu edilir ve pratiktir, ancak genetik olarak kararsızdır. Kendiliğinden kromozomlarını kaybedebilir veya kazanabilirler; bu nedenle de kromozom hasarı test sonuçlarında daha yüksek bir değişkenlik olasılığını işaret ederler. Sonuç olarak, doğrudan insanlardan elde edilen lenfositler uygun bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Kültür seçimi ayrıca, kontaminasyon, toksisite değerlendirmesi ve ayrıca lamların değerlendirmesini içeren bazı başlıklarla da ilgilidir.

Günümüzde kromozom aberasyon testi, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) tarafından tanımlanan birkaç aşamaya göre yapılmaktadır (Swierenga ve ark., 1991). Kromozom aberasyonu testinde, kromozomların en rahat gözlenebildiği metafazevresinde tutulabilmesi için kültüre demekolsin, kolşisin veya kolsemid eklenir (Şekil 2.11). Böylece, seçilen hücrelerin metafazda tutuklanması sağlanarak daha net bir hücre morfolojisi elde edilir. Bunu takiben hücreler, lamlara sabitlenmeden önce hipotonik bir çözelti ile muamele edilir. Son aşamada, boyama işlemine başlamadan önce lamlar havada kurutulur. Işık mikroskobu, kromozom hasarını ve bunun farklı yapısal tiplerdeki yansımalarını belirlemek için kullanılır. Farklı maddelerle tedaviden kaynaklanan hasarlı hücre sayısındaki artış, bir genotoksisite faktörüdür.

Hücre kültürleri, genellikle S9 fraksiyonu (fare karaciğerinin bir kısmı) isimli bir pozitif kontrol ile muamele edilir; ancak Mitomisin C de çalışmalarda kullanılabilir. Karşılaştırmayı geliştirmek için kültürler ayrıca bir çözücü (solvent kontrol) varlığında işleme tabi tutulur. Kromozomal yapıların gözlemlenmesi ile poliploidi veya hatta anöploidi varlığı fark edilir. Bu yapıların mutlaka genotoksisite faktörleri olarak sınıflandırılması gerekmez (Obe ve ark., 2002).



Şekil 2.11. *In vitro* kromozom aberasyon testi (Mateuca ve ark., 2006)

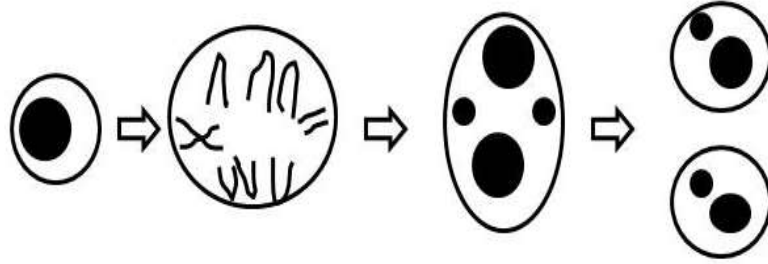
2.4.3. Mikronükleus testi (MN)

Kromozomal hasarın değerlendirilmesi, bir test bileşiğinin genotoksik potansiyelini belirlemenin önemli bir yoludur. MN, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Mikronükleus testi, genotoksik karsinojenlerin taranmasında başarılı ve güvenilir bir yöntem olarak OECD'nin kimyasal test rehberinde 1980'lerin sonundan itibaren yer almaktadır (Diaz ve ark., 2007).

Mikronükleer binükleer lenfositlerin (MNBNC'ler) sıklığı, kanser tanısı alan bireylerde periferik lenfositlerde önemli bir gösterge faktörü olarak belirlenmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri karşılaştırıldığında, hasta bireylerde daha fazla kromozom anormalliği gözlenmiştir (Schmid, 1976).

MN testi, kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikronükleus oluşumunun kökeni, hücre bölünmesi sırasında çeşitli nedenlerle anafazdağ ipliklerince çekilmeyip geride kalan (lagging) kromatinden gelmektedir. Bu yapılar, hücre bölünmesi sonrasında çekirdekten bağımsız mikronükleusun oluşumuna yol açabilirler. Bu nedenle, yavru hücrelerin sitoplazmasında, çekirdeklerin aynı morfolojisine ve boyama özelliklerine sahip, belirgin şekilde ayrı küçük küresel nesnelere olarak görülürler (Şekil 2.12., Countryman ve Heddle, 1976). Mikronükleus,

ana çekirdeğe göre küçük boyutlarından dolayı böyle adlandırılmaktadır. Mikronükleus, ana çekirdeğin üçte birinden daha küçük bir çapa sahip olmalı ve ana çekirdekten açıkça ayırt edilebilmelidir. Sitokinez-blok yönteminde, analiz için seçilen binükleer hücreler, açıkça ayırt edilebilen iki ana çekirdeğe sahip olmalıdır. Örneğin, apoptoza uğrayan hücrelerde, mikronükleus puanlaması yapılmamalıdır; çünkü, gözlemlenen mikronükleuslar, apoptotik süreç sırasında nükleer parçalanmanın bir sonucu olabilirler (Kirsch ve ark., 2000).



Şekil 2.12. Mikronükleuslu hücre oluşumu. Anafazda bölünen bir hücrede gecikmeli tam kromozomlardan ve asentrik kromozom parçalarından mikronükleus formasyonunun kökeni. Sitokinez-blok mikronükleus tahlilinde, bir nükleer bölünme geçirmiş ve bu nedenle bir mikronükleus barındıran hücreler olarak ifade edilebilen hücreler (Fenech ve ark., 1999).

Mikronükleus oluşumunu açıklayabilen iki ana neden vardır (Jagetia ve ark., 2001). İlk neden, çift zincir DNA kırılmalarının simetrik veya asimetrik kromatid ya da kromozom değişimlerine ve aynı zamanda kromatid ve kromozom fragmentlerinin oluşumuna yol açmasıdır. İkinci neden ise homolog rekombinasyon tamir yollarıyla ilişkili genlerdeki işlev bozukluklarının hücreyi hataya yatkın bir homolog olmayan uç birleştirme tamirine yönlendirmesi sonucu oluşan kromozom fragmentleridir (Heddle ve Carrano, 1977).

Sayısal ve yapısal kromozom aberasyonları için bir ölçü olarak, Mikronükleus testi (MN), temsili bir hücre fraksiyonundaki mikronükleus içeren hücrelerin sıklığını, genellikle hayvan başına (*in vivo*) veya konsantrasyon başına (*in vitro*) en az 2000 hücrenin değerlendirilmesi ile oluşmaktadır. Cytochalasin B'nin (Sit. B) eklenmesi nedeniyle, mikronükleus skorlaması interfazda bulunan ve bir mitotik döngü geçirmiş

çift çekirdekli hücreler ile tek çekirdekli hücrelerde ayrı ayrı yapılmaktadır (Romagna ve Staniforth, 1989; Frieuff ve Romagna, 1994).

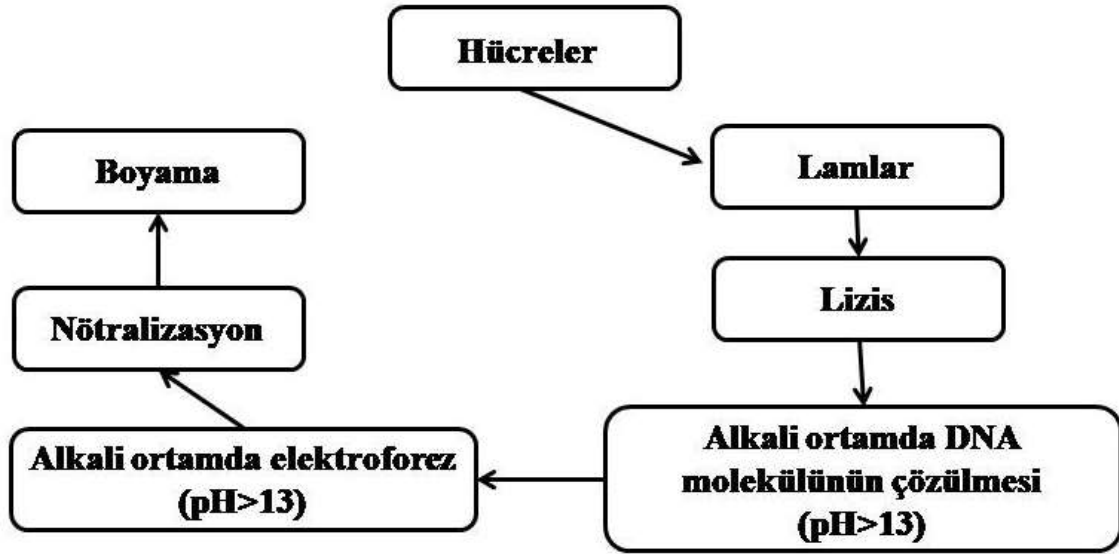
Öte yandan sitotoksisite, hücre büyümesi, hücre sayıları, çekirdeklenme (yani, çift çekirdekli yüzde), bölünme/çoğalma indeksi gibi çeşitli parametreler de ölçülebilir (Kirsch ve ark., 2000).

Literatür, mikronükleusun önemli bir biyobelirteç olduğunu ve MN'nin, kromozomal kayıp veya mitotik aparatın bozulmasının tespiti için güvenilir bir genotoksisite testi olduğunu göstermektedir. CA ile karşılaştırıldığında, MN daha hızlı, daha kolay ve daha güvenilirdir (Evans ve ark., 1959; Pellegrini ve ark., 2014). Bazı yazarlar, insan bireylerinin örneklerinde periferik kan lenfositlerindeki MN frekanslarının takibinin biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanların etkilerini tahmin etmek için çok etkili bir test olabileceğini düşünmektedir (Fenech, 2007). İnsan popülasyonunda artan mikronükleus frekansları ile ilişkili kanser oluşumu riski yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Ayrıca, diyet faktörlerinin (Fenech ve ark., 1998) ve çok çeşitli çevresel klastojen ve anöjenlere maruz kalmanın yanı sıra MN arka plan sıklığını etkileyen en önemli iki faktör yaş ve cinsiyettir (Fenech ve Morley, 1986; Fenech ve ark., 1999).

2.4.4. Komet testi (CT)

Genotoksisite için mevcut yöntemler arasında, Komet testi (CT), temel olarak basitliği, duyarlılığı ve DNA zinciri kırılmasını veya kromozomal kaybı (potansiyel olarak kabul edilebilen) ölçmek için çok yönlü özelliği nedeniyle genotoksisite için en yaygın testlerden biridir (Kitamoto ve ark., 2015). Komet testi veya tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) testi, ilk olarak 1984 yılında, memeli hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarının tespiti için bir mikro-elektroforetik teknik olarak tanıtılmıştır (Nandhakumar ve ark., 2011). Hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulandığı ve az miktarda hücre gerektirdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, bir fiziksel uyarı veya kimyasal mutajenin neden olduğu DNA hasarının derecelendirilmesi mümkündür.

Elektroforetik tamponun farklı pH değerlerine göre, kuyruklu yıldız testinin iki varyasyonu mevcuttur: nötr yöntem (pH 8,4) ve alkali yöntem (pH> 13, Şekil 2.13). Nötr yöntem, yalnızca çift zincir kırılmaların (DSB'ler) tespiti için kullanılabilir ve tek zincir kırılmaları (SSB'ler) için kullanılamaz. Alkali yöntem ise daha yüksek duyarlılığı nedeniyle hem tek hem de çift zincir kırılmaları belirlemek için kullanılabilir (Braaflaft ve ark., 2016; Collins ve ark., 2014).



Şekil 2.13. Komet Testi'nin şematik görünümü (Tice ve ark. 2000).

Komet yöntemi, farklı moleküler ağırlıklara sahip DNA moleküllerine ve bu moleküllerin alkali pH'a bağlı olarak geçirdikleri elektriksel değişikliklere dayanır. Yöntem doğrudan moleküllerin elektriksel göç alanı ile ilgilidir. Elektrik alan etkisi altında kırık DNA parçaları çekirdekten göç eder ve bu göç floresans mikroskopi ile gözlemlenebilir (Nandhakumar ve ark., 2011). Hasarlı DNA fragmentlerinin varlığı durumunda kuyruklu yıldız şeklinde bir görünüm oluşur. Yöntemin adı da buradan gelmektedir. Kuyruklu yıldız görünümünün nedeni, hasarlı fragmentlerin elektrik alanında, ağırlıklarının ve dolayısıyla yük durumlarının farklı olmasından dolayı farklı hızlarda hareket etmeleridir (Östling ve Johanson, 1984; McKelvey-Martin ve ark., 1993; A. Şekeroğlu ve ark., 2011; A. Şekeroğlu ve ark., 2011).

Değişkenlik yaratan en önemli nedenler, agaroz konsantrasyonu, elektroforez süresi ve voltaj gradyanı gibi deneysel koşullardır. Parçalanma ve alkali inkübasyon süresi, enzim konsantrasyonu ve elektroforez sıcaklığı gibi diğer faktörler de sonuçta önemli bir rol oynayabilir (Nandhakumar ve ark., 2011). Sonuç olarak, Komet yöntemi ile komet alanı, komet yoğunluğu, kometuzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametrelerin hesaplanması mümkündür (Östling ve Johanson, 1984; McKelvey-Martin ve ark., 1993; A. Şekeroğlu ve ark., 2011).

Bugüne kadar, kolay uygulanabilen ve çok yönlü bir test olarak CT, eko-genotoksisite (Pellegrini ve ark., 2014), toksikoloji (Glei ve ark., 2016), farmakoloji (Llana-Ruiz-Cabello ve ark., 2016) ve nutrigenomik (Bishop ve ark., 2015) gibi birçok alanda kullanılmıştır. Ayrıca CT'nin esansiyel hipertansiyon (Subash, 2016), kronik böbrek hastalığı (KBH) (Corredor ve ark., 2016), tip 2 diyabet (Pittaluga ve ark., 2015) ve hatta kanser kemoprevansiyonu (Santoro ve ark., 2016) gibi çeşitli başlıklar altında da kullanımı ile ilgili literatür bulunmaktadır.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, bir flavonoid olan Floridzinin genotoksik/anti-genotoksik potansiyelini kan kültürü yöntemleriyle ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca Phl ve MMC ikili kombinasyonu ile MMC tarafından indüklenen genotoksik etkinin ne yönde ve ne kadar değiştiği değerlendirilmiştir.

Bu nedenle üç *in vitro* test uygulanmıştır: Kromozom Aberasyon Testi (CA), Mikronükleus Testi (MN) ve Komet Testi (CT). Kan lenfosit hücreleri Floridzin, MMC ve solvent kontrollerine maruz bırakılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Floridzin (274314-1G, SigmaAldrich, Steinheim) satın alınmıştır. Kimyasal, toz halindedir ve çalışmalar süresince +4 °C'de saklanmıştır.

0,04 gr Phl tartılır ve 160 ml %100'lük EtOH ve 840 ml dH₂O çözeltisinde çözülerek stok hazırlanır. Daha iyi çözünmek için manyetik karıştırıcı üzerinde 60 °C'de 5 dakika süreyle çözünene kadar ısıtıldı. Hazırlanan çözelti sonraki deneyler için buzdolabında -20 °C'de saklandı. Çalışmamızda, Phl'nin 250 µg/ml'lik doz ile çalışılmıştır.

Genotoksik/anti-genotoksik veya kanserojen/anti-kanserojen etkiyi belirlemek için MMC (Kyowa-Hakko-Kogyo, Tokyo, Japonya) 250 µg/ml konsantrasyonda kullanımdan hemen önce dH₂O ile çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan MMC çözeltisi kan kültürüne hacimce 1:1000 oranında seyreltilerek eklenmiş, son konsantrasyon 0,25 µg/ml şeklinde belirlenmiştir.

3.2. Lenfosit Hücreleri

Bu çalışma için, insan periferik kan lenfositleri, sağlıklı, sigara içmeyen ve yakın zamanda herhangi bir kimyasal maddeye maruz kalmamış bireylerden elde edilmiştir. Bu amaçla dört donörden (iki kadın ve iki erkek) alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

Periferik kan örnekleri (5 ml) steril koşullar altında venipunktür yoluyla heparinize tüplere alınmıştır. Toplamadan sonra, tüm kan örnekleri rastgele kodlanmış, laboratuvara taşınmış ve mümkün olan en kısa sürede (genellikle kan örneğini takip eden 2 saat içinde) işlenmiştir. 5 ml kültür ortamına tam kan (0,5 ml) ilave edilmiştir.

3.3. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Lenfosit kültürü, %20 fetal buzağı serumu (FBS, F7524, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), penisilin/streptomisin (P3444, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ve L-Glutamin (G7513, Sigma-Aldrich, Irvine, United Kingdom) ile desteklenmiş 5 ml RPMI 1640 (R0883, Sigma-Aldrich, Irvine, United Kingdom) besiyerine (pH 6,8 – 7,2) 0,5 ml heparinize tam kan eklenerek hazırlandı. Lenfositler, sulu bir çözelti formundaki ham bir ekstrakt olan ve lenfositlerin bölünmesini uyarmak için kullanılan fitohemagglutinin (PHA-L, Biochrom AG) tarafından uyarıldı. PHA-L, kültür ortamında yaklaşık %2'lik bir nihai konsantrasyonda kullanıldı (son konsantrasyon 2-10 µg/ml PHA-L). Lenfosit kültürü besiyerleri hemen kullanılmak veya -20 °C'de saklanmak üzere hazırlandı.

3.4. Doz Seçimi

Literatürden elde edilen veriler ve ön doz deneme çalışmaları ile Floridzin dozları 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml şeklinde belirlenmiş ve testlerde bu dozlar uygulanmıştır. MMC için ise literatüre başvurularak klinik düzeyde anlamlı bir doz olan 250 µg/ml seçilmiştir. Kombinasyon çalışmalarında Phl 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml dozları ile MMC'nin 0,25 µg/ml dozu eş zamanlı olarak kombine edilmiştir. Bunlara ek olarak, deney grupları dışında negatif kontrol ve solvent kontrol grubu da çalışılmıştır.

Kanın kültür ortamına eklenmesiyle inkübasyonun başlamasından 24 saat sonra (37°C) lenfosit kültürüne yukarıda belirtilen konsantrasyonlar eklenerek deney grupları hazırlanmıştır. Bu dozlar, 4 donörden alınan lenfosit kültürlerine uygulanarak kromozom aberasyonu, Mikronükleus ve Komet testleri gerçekleştirilmiştir. Her bir donöre ait kan örnekleri için seçilen ortak deney grupları şu şekilde oluşturuldu: Negatif

kontrol (distile su), solvent kontrol (Etanol %100), 125 µg /ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml Phl, 0,25 µg/ml MMC ve kombinasyon dozları (125 µg/ml Phl + MMC; 250 µg/ml Phl + MMC; 500 µg/ml Phl + MMC).

3.5. Kromozom Aberasyon (CA) Testi

Bu çalışmada, sağlıklı, sigara içmeyen ve alkol kullanmayan dört donörden (2 kadın, 2 erkek) steril ve heparinize tüpler kullanılarak kan örnekleri alındı. Uygulanacak dozlar ve diğer solüsyonlar deneyden hemen önce hazırlandı. Sıcaklığı inkübatörde 37 °C'ye getirilmiş 5 ml hücre kültürü besiyerlerine 0,5 ml tam kan ilave edildi. Besiyerleri hemen 72 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan 48 saat sonra doz seçimi kısmında belirlendiği şekilde uygulama gerçekleştirildi. Harvest - uygulamanın 48. saatinden - iki saat önce, mitoz bölünmenin metafazda durdurulması için her kültür ortamına demecolcine (10 µg/ml) ilave edildi.

Kültür periyodunun sonunda hücreler 3500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı; ardından, önceden inkübatörde 37 °C'de ısıtılmış 0,075 M KCl hipotonik solüsyon eklendi ve 8 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Süpernatant, 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrasında atıldı ve daha sonra soğuk metanol: glasiyal asetik asit (oda sıcaklığında) (3:1) tüp içerisine pipetlenerek hücreler fikse edildi. Tüpler -20 °C'de 25 dakika inkübe edildi. Fiksatif uygulaması üç kez tekrarlandı ve her seferinde kültürler 3500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Son hasattan sonra her tüpe 2 ml fiksatif eklendi. Son olarak, konsantre hücre süspansiyonu önceden etanol ile temizlenen ve -20 °C'de saklanan lamaların üzerine damlatılarak metafaz yayma preparatı hazırlandı. Deneyden önce, lamalar üzerine çalışmanın adı, uygulama dozu, hazırlanma tarihi ve donör bilgileri etiketlenerek muhafaza edildi.

Sabit hücre süspansiyonları temiz lamlara bırakıldıktan sonra hava ile kurutuldu. Oda sıcaklığında kurutulmuş lamalar, 15 dakika boyunca %5 Giemsa (pH 6,8) ile boyandı (Perry ve Wolff, 1974). Daha sonra lekeleri çıkarmak için distile su ile durulanmış ve tekrar kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Slaytların incelenmesi için ışık mikroskobu, sırasıyla interfazdaki hücreler için 40X ve metafazdaki hücreler için 100X kullanıldı. Metafaz hücreleri, immersiyon yağı kullanılarak incelendi. Kırık, gap, halka ve değişim gibi kromozom ve kromatid aberasyonları gözlemlendi. Kromozom sayıları farklı olan yani 46 kromozomdan az veya fazla olan hücreler de kaydedildi (Nigro ve ark., 2003). Her bir lamda, bütünlüğünü koruyan ve daha iyi saçılmış kromozomlara sahip olan ve mikroskop altında kolayca gözlemlenen metafazdaki 50 hücre seçildi. Mitotik indeks (MI), her konsantrasyon ve donör için analiz edilen 2000 hücredeki metafaz sayısı olarak hesaplandı.

$$\% \text{ Mitotik İndeks} = \text{Bölünen hücre} / \text{Toplam hücre} \times 100$$

3.6. Mikronükleus (MN) Testi

Lenfositlerde Mikronükleus testinin analizi için, sağlıklı, sigara içmeyen ve alkol veya herhangi bir ilaç kullanmayan dört donörden (2 kadın, 2 erkek) steril ve heparinize tüpler içerisine periferik kan örnekleri alındı. Heparinize tam kan (0,5 ml) 5 ml kültür ortamına ilave edildi ve 37 °C'de inkübe edildi. Doz seçimi kısmında belirlenmiş olan dozlar ekimden 48 saat sonra kan kültürlerine uygulandı.

Lenfosit kültürlerine 48 saat boyunca seçilen dozlarla muamele edildi. Bir sitokinez inhibitörü olan sitokalsin-B (Cyt-B, 6 µg/ml), inkübasyonun başlamasından 44 saat sonra kültürlerle ilave edildi. Cyt-B, çift çekirdekli hücreler elde etmek için kullanıldı. Kültürler yeniden 37 °C'de inkübe edildi ve 28 saat sonra uygulama sonlandırıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 800 rpm'de 8 dakikada santrifüj edilerek hasat edildi. Daha sonra, peletler oda sıcaklığında 4 dakika süreyle hipotonik solüsyonda (0,075 M KCl) bekletildi. Bundan hemen sonra hücreler, 800 rpm'de 8 dakika santrifüjlendi. Pelet kısmında bulunan hücreler üzerindeki süpernatant atıldı ve metanol:glasiyal asetik asit (3:1) içeren soğuk bir fiksatif içinde sabitlendi. Fiksasyon 3 kez tekrarlandı ve lenfositler her seferinde 800 rpm'de 8 dakikada santrifüjlendi. Son olarak, fikse edilmiş hücre süspansiyonları, önceden etanol ile temizlenmiş ve -20°C'de saklanan temiz lamlara damlatıldı. Daha sonra slaytlar havada kurutuldu. Slaytlar, 15

dakikada %5 Giemsa boyama solüsyonu (Sorensen Tamponu ile seyreltilmiş, pH 6,8) ile boyanmıştır. Boyamadan hemen sonra lamalar distile su ile yıkandı ve havada kurutuldu (Takeiri ve ark., 2017).

Bir mikronükleus, ana çekirdeğin en fazla 1/3 boyutunda ve sitoplazmanın içinde bulunan ve benzer boyamaya sahip bir çekirdek parçacığı olarak tanımlandı. Slaytların incelenmesi için 400X büyütmede ışık mikroskobu kullanıldı. Her tedavi için toplam 1000 tane çift çekirdekli hücre sayıldı. Binükleer hücrelerden mikronükleuslu olanlar tespit edilerek kaydedildi. Ayrıca her uygulama grubu için 1000 hücre daha rastgele kaydedilmiş ve bir, iki, üç veya dört çekirdekli hücre sayısı belirlenmiştir (Fenech, 2000). Bu hesaplamalar aşağıdaki formül için kullanılmıştır:

$$NDI = (1x N_1 + 2x N_2 + 3x N_3 + 4x N_4) / (N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

Bu formülde, Nükleer bölünme indeksi (NDI), hücrenin çoğalma kabiliyetine göre anormal şekilde artan veya azalan hücresel mitotik bölünmenin bir indeksidir; N_1 -mononükleer hücre sayısı; N_2 -binükleer hücre sayısı; N_3 -trinükleer hücre sayısı; N_4 -tetranükleer hücre sayısını ifade eder.

3.7. Komet Testi (CT)

Antikoagülan olarak heparin içeren steril tüplerde dört sağlıklı donörden heparinli tüpler içerisine kan örnekleri alındı. Dört komet çalışması, yukarıda doz seçimi kısmında belirtilen dokuz doz ile gerçekleştirildi. Seçilen dozlar, kan kültürüne periferik kanın eklenmesinden 24 saat sonra uygulandı. Hücreler, 37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra 4 dakika 500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve hücreler, 4 dakika 500 rpm'de tekrar santrifüjlendi. Santrifüj işleminin sonunda pelletler dikkatlice karıştırıldı ve bunun 1 ml'si etiketlenerek hazırlanmış PBS içeren Eppendorf tüplerine aktarıldı. Ardından, 100 µl hücre örneği başka bir Eppendorf tüpünde, 37°C'de bir su banyosunda önceden ısıtılmış düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile karıştırıldı.

Alkali tek hücreli jel elektroforezi, orijinal olarak Singh ve diğerleri (1988, 1997) tarafından geliştirilen prosedüre göre ve tarafımızdan birkaç modifikasyon ve küçük değişiklikler ile gerçekleştirildi. Süspansiyonlar, normal eriyen agaroz (NMA) ile

önceden kaplanmış lamalar üzerine hemen pipetlendi. Lamlar 76,2x25,4 mm lamelle kapatıldı ve LMA'nın katılaşmasına izin vermek için 25 dakika 4 °C'de bekletildi. Daha sonra lameller çıkarıldı ve lamalar dikkatlice soğuk lizis tamponuna (2,5 M NaCl, 100 mMNA₂EDTA, 10 mMTris, %1 Triton ve %10 DMSO) daldırıldı ve gece boyunca 4 °C'de karanlıkta tutuldu.

Maksimum 24 saat sonra lamalar, yürütme tamponu (18 g NaOH, 0,5602 g EDTA) içeren yatay ve ışık geçirmeyen bir elektroforez tankına yerleştirildi. Lamlar, elektroforezden önce tuz konsantrasyonunun dengelenmesi ve daha fazla DNA çözülmesine (unwinding) izin verecek biçimde 25 dakika süre ile bu çözeltiye maruz bırakıldı. Daha sonra elektroforez gerçekleştirildi (300 mA, 50 V, 28 dakika). Lamlar elektroforez tankından bir şaleye taşınarak nötralizasyon tamponu (pH 7,5) ve soğuk damıtılmış su ile 5'er dakika yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Ardından, lamalar 5 dakika soğuk etanol içinde tutuldu ve havada kurutuldu.

Kurutulan lamalar etidyum bromür (10 µg/ml) ile boyandı. Örnek başına iki kopya olarak hazırlanan lamaların her birinde toplam 50 hücre incelendi. Slaytlar, bir kamera ile donatılmış bir floresans mikroskobu (Novel, N-800M, Çin Halk Cumhuriyeti) altında değerlendirildi. Her uygulama için mikroskop altında rastgele elli komet görüntüsü Kameram 21 yazılımı (Argenit, İstanbul) yardımıyla analiz edildi. Analiz edilen komet parametreleri: komet alanı, komet yoğunluğu, komet uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzunluğu, olive kuyruk momenti ve kafa % DNA, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesidir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama değerler ve standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analizde SPSS 23.0 paket bilgisayar programı kullanılmıştır. Her bir parametrenin normal dağılım analizleri için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmış, skewness ve kurtosis değerlerine bakılmıştır. Buna göre, normal dağılım gösteren verilerde one-way ANOVA, normal dağılım göstermeyen verilerde ise nonparametrikKruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek için post hoc analizleri

gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, Levene testinin sonucuna göre Tukey HSD ya da Tamhane T2 testi seçilmiştir. Cinsiyetler arasında uygulamaların fark yaratıp yaratmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Wilcoxon testi ile değerlendirme yapılmıştır.

4. BULGULAR (BULGULAR ve TARTIŞMA)

4.1. Lenfosit Kültürü Kromozom Aberasyonu Testi (CA) Sonuçları

Bu çalışmada kromozom aberasyon testi yapılmış ve sonuç olarak tek başına Phl ve MMC'nin uygulandığı ve aynı zamanda MMC+Phl kombinasyonunun kullanıldığı 9 doz yer almıştır. Bu deney sonucunda, farklı kromozom hasarı tipleri tespit edilmiştir: kromozom tipte gap, kromozom tipte kırık, kromozom tipte exchange, kromozom tipte ring. Total kromozom aberasyonu oranları ve %MI (mitotik indeks) değerleri Çizelge 4.1.1., Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir.

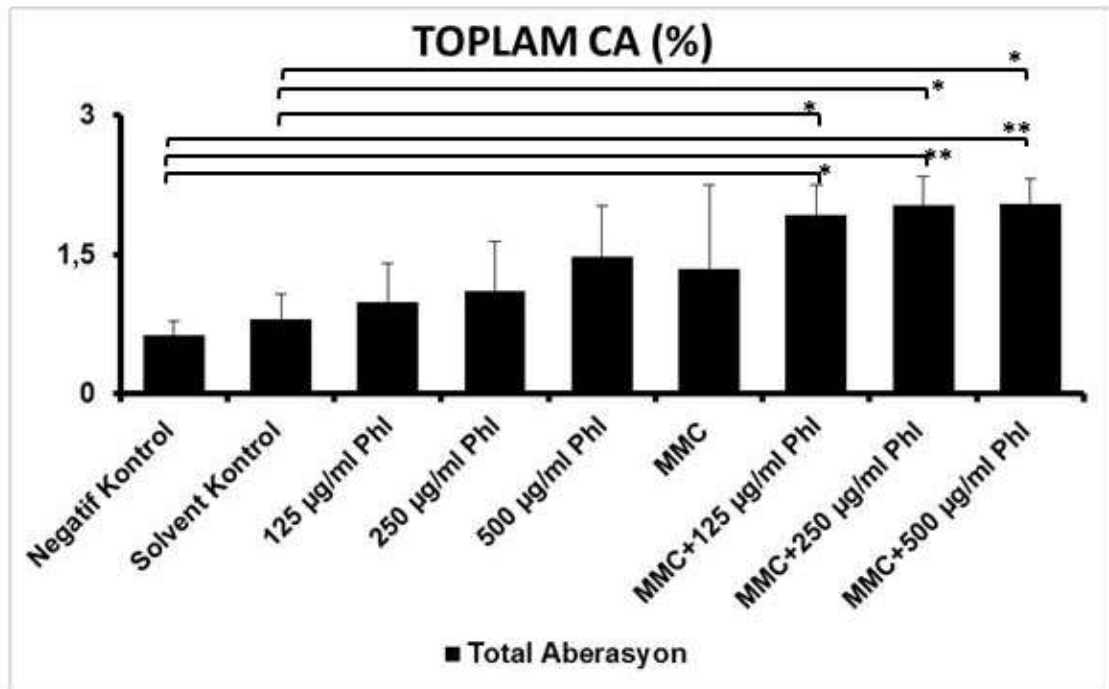
Çizelge 4.1. Floridzin ve Mitomisin C ile tedavi edilen her donörün lenfosit kültüründe kromozom aberasyonlarının indüksiyonu ve mitotik indeks değerleri

Doz ($\mu\text{g/ml}$)	N	Kromozom Gap	Kromozom Kırık	Kromozom Ring	Kromozom Exchange	Total Aberasyon	% MI (Total)
Negatif Kontrol	4	29,25 \pm 3,86	25,00 \pm 6,98	1,50 \pm 0,58	67,50 \pm 29,47	0,63 \pm 0,15	4,89 \pm 2,41
Solvent Kontrol	4	37,00 \pm 13,98	33,00 \pm 8,29	6,50 \pm 1,91	84,25 \pm 36,54	0,80 \pm 0,27	6,36 \pm 0,38
125 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	47,50 \pm 16,94	30,50 \pm 16,46	5,25 \pm 2,22	112,75 \pm 57,14	0,98 \pm 0,42	5,60 \pm 2,54
250 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	63,25 \pm 7,14	42,25 \pm 9,60	3,75 \pm 2,36	161,50 \pm 68,09	1,11 \pm 0,53	6,79 \pm 1,14
500 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	68,75 \pm 13,30	43,50 \pm 11,56	5,75 \pm 2,22	177,25 \pm 100,00	1,48 \pm 0,55	7,46 \pm 1,00
MMC	4	57,25 \pm 30,24	51,00 \pm 24,15	3,50 \pm 0,58	157,00 \pm 135,46	1,34 \pm 0,91	4,48 \pm 1,78
MMC +125 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	68,25 \pm 14,00	48,75 \pm 18,13	6,25 \pm 2,75	261,25 \pm 56,75	1,93 \pm 0,33*†	4,03 \pm 3,33
MMC + 250 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	81,25 \pm 13,70	52,75 \pm 5,44	5,75 \pm 3,59	267,00 \pm 48,00	2,03 \pm 0,31**†	3,48 \pm 2,16
MMC + 500 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	77,00 \pm 12,78	41,75 \pm 10,31	5,50 \pm 2,08	288,00 \pm 44,16	2,05 \pm 0,27**†	3,44 \pm 2,60

* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, *p < 0,05; **p < 0,01

† :Solvent kontrol grubu ile karşılaştırma, †p < 0,05

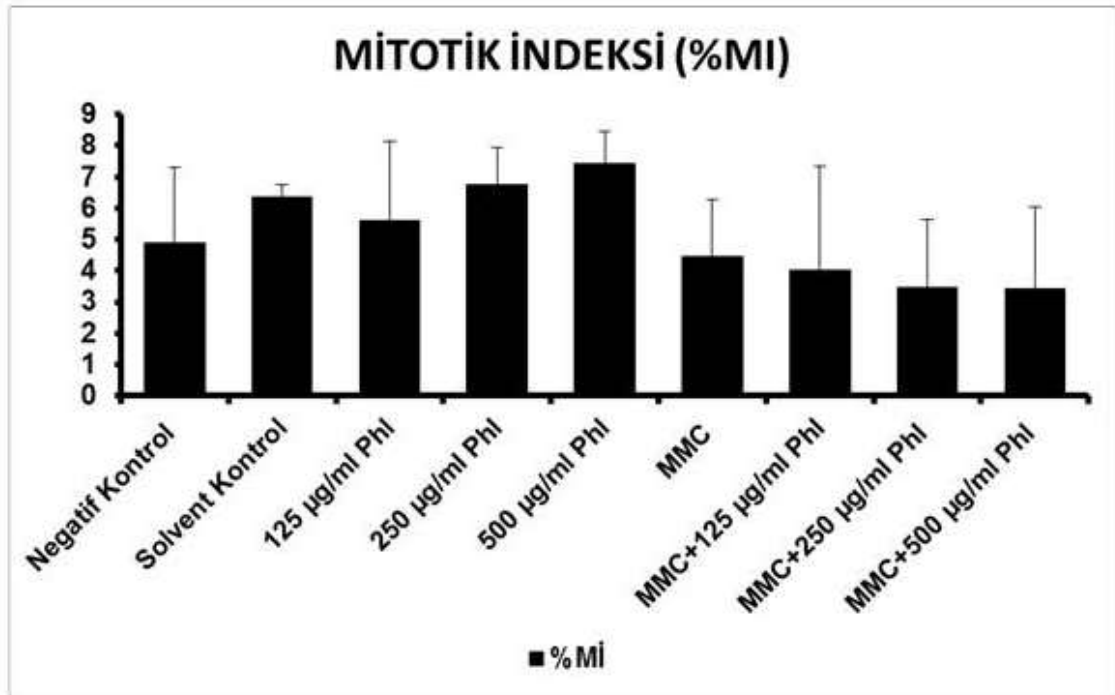
Çizelge 4.1, insan periferik kanında Phl ve MMC'ye maruz kalan lenfositlerde gerçekleştirilen CA testi sonucunda metafazdaki hücrelerde ortaya çıkan kromozom anomalilerinin sıklığını göstermektedir. Bu çizelgede bulunan total kromozom aberasyon verilerinden yararlanarak Şekil 4.1'deki grafik hazırlanmıştır. Total kromozom aberasyon verilerine, normalite testi uygulanarak parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Levene Testi sonucuna göre de post hoc analizlerinden Tukey HSD testi uygulanmıştır. Uygulanan Phl dozları ve solvent kontrol arasında istatistiki anlamlı bir farklılık değerlendirilmemiştir. Floridzinin her üç dozunun da total kromozom aberasyonunda negatif kontrole göre istatistiki anlamlı olmayan küçük bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir ($p > 0,05$). Negatif kontrol ve MMC arasında istatistiki anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). MMC ve Phl'nin üç dozunun kombinasyonlarının Total Kromozom Aberasyonlarını negatif kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükselttiği ($p < 0,05 - 0,005$) değerlendirilmiştir. Ancak, total kromozom aberasyonlarında MMC ve Phl kombinasyon dozlarının MMC'nin tek başına uygulamasının meydana getirdiği aberasyon oranları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Şekil 4.1. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin total kromozom aberasyon oranları (%)

Şekil 4.2, insan periferik kanında Phl ve MMC'ye maruz kalan lenfositlerde gerçekleştirilen CA testi sonucunda mitotik indeks değişimini göstermektedir. Mitotik indeks verilerine normalite testi uygulanarak non-parametrik analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene Testi sonucuna göre de post hoc testlerden Tukey HSD testi uygulanmıştır. Uygulanan Phl dozları ve solvent kontrol arasında istatistiki anlamlı bir farklılık değerlendirilmemiştir. Phl'nin her üç dozunun da %MI açısından negatif kontrole göre istatistiki anlamlı olmayan bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir ($p > 0,05$). Negatif kontrol ve MMC arasında istatistiki anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). MMC + Phl'nin üç dozunun kombinasyonlarının %MI değerlerinde solvent kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir düşüş kaydettiği görülmüştür ($p > 0,05$). Bununla birlikte, % MI değerlerinde MMC + Phl kombinasyon dozlarının MMC'nin tek başına uygulaması ile ortaya çıkan % MI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.2. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin mitotik indeks (%MI) oranları.

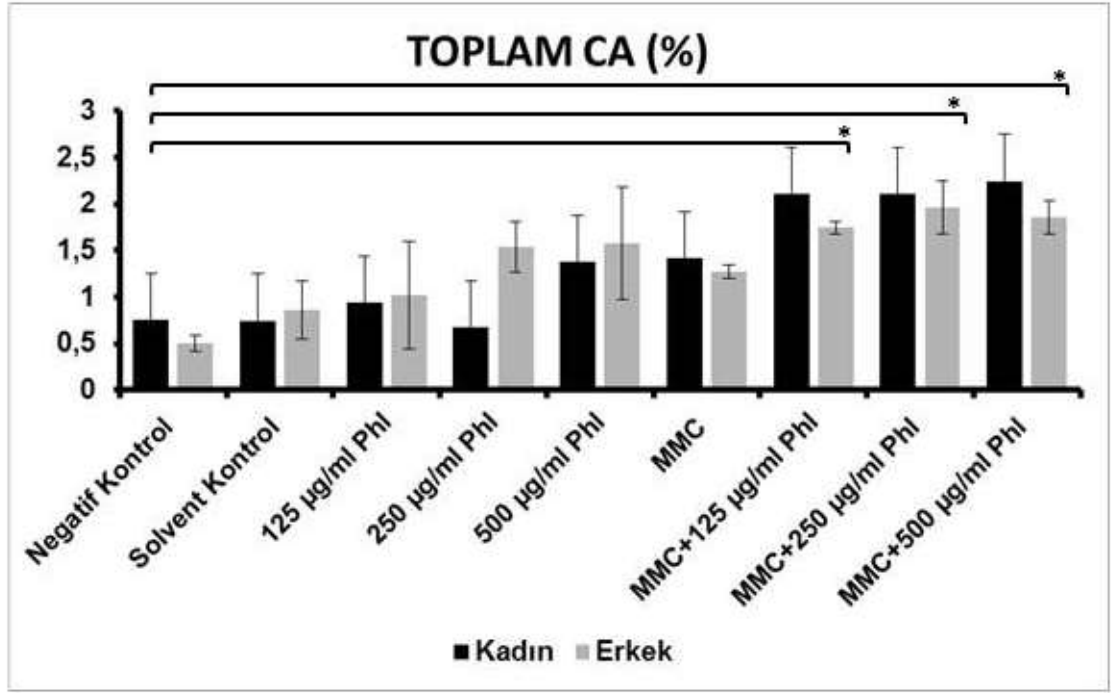
Cinsiyetlere göre total kromozom aberasyonu oranları ve %MI değerleri çizelge 4.2. ve Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Cinsiyetler arasında doz gruplarının tek tek toplam kromozom aberasyonu ve MI parametreleri açısından fark olup olmadığı nonparametrik testlerden Wilcoxon testi ile analiz edilmiştir.

Çizelge 4.2. Floridzin ve Mitomisin C ile tedavi edilen her donörü lenfosit kültüründe cinsiyete göre kromozom aberasyonlarının indüksiyonu ve mitotik indeks değerleri.

Doz (µg/ml)	Total Aberasyon		% MI	
	(Kadın)	(Erkek)	(Kadın)	(Erkek)
Negatif Kontrol	0,75±0,02	0,51±0,08	4,55±3,89	5,23±1,38
Solvent Kontrol	0,75±0,33	0,86±0,31	6,20±0,57	6,53±0,04
125 µg/ml Phl	0,94±0,42	1,02±0,58	4,23±3,15	6,98±1,38
250 µg/ml Phl	0,68±0,18	1,54±0,27	5,85±0,07	7,73±0,60
500 µg/ml Phl	1,38±0,71	1,58±0,60	6,73±0,11	8,20±0,92
MMC	1,42±1,57	1,27±0,07	3,25±1,63	5,70±0,92
MMC + 125 µg/ml Phl	2,11±0,43*	1,75±0,06*	1,88±0,04	6,18±3,85
MMC + 250 µg/ml Phl	2,11±0,42*	1,96±0,29*	1,70±0,07	5,25±1,20
MMC + 500 µg/ml Phl	2,25±0,17*	1,85±0,18*	1,55±0,28	5,33±2,44

* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, *p < 0,05

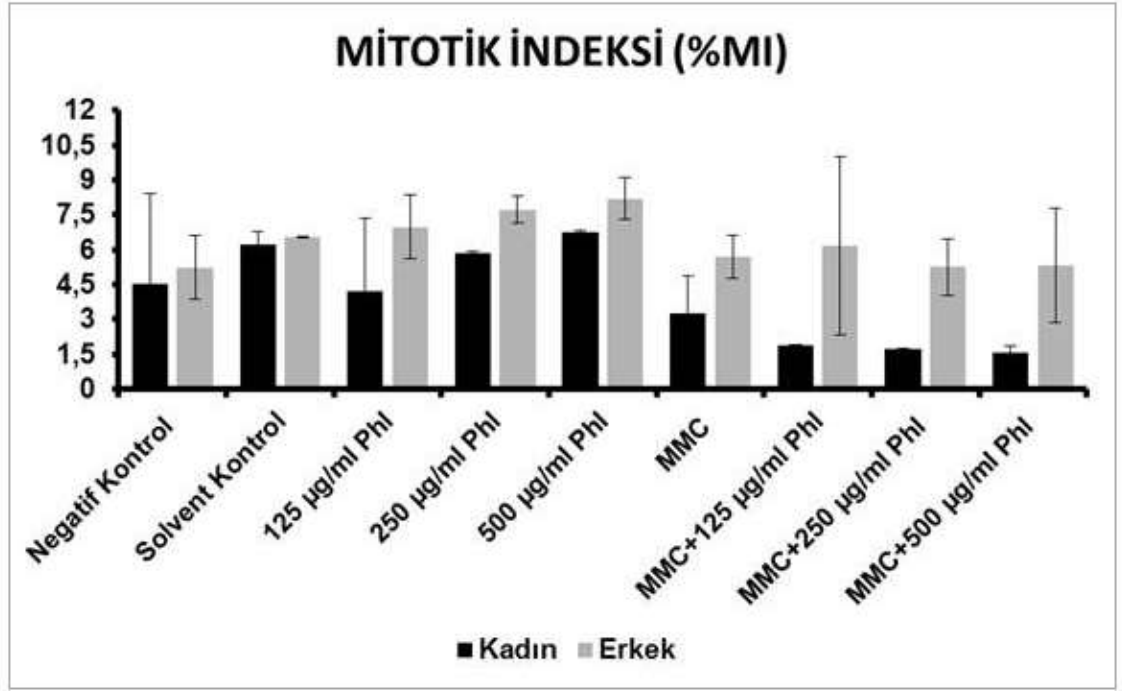
Cinsiyetin toplam kromozom aberasyonu ve % MI parametreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir (Çizelge 4.2, p>0,05). Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, kadınlarda ve erkeklerde tek başına Phl ve MMC uygulamalarından sonra toplam kromozom aberasyonu anlamlı olmayan bir artış göstermiştir.



* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, *p < 0,05

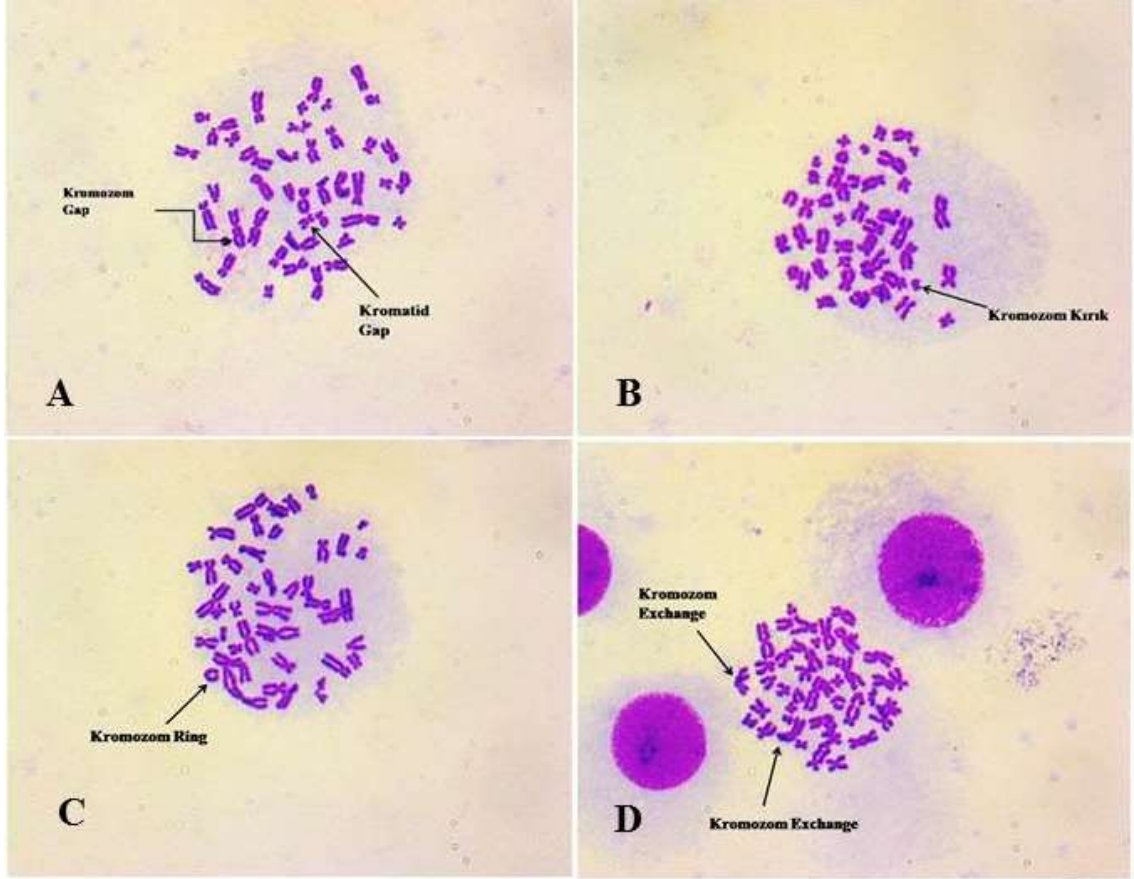
Şekil 4.3. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin cinsiyete göre total aberasyon oranları (*:Two-Way ANOVA sonuçlarına göre konulmuştur).

Şekil 4.4'te ise PhI, MMC ve PhI+MMC uygulamalarının ardından %MI değerlerinin cinsiyete göre dağılımları gösterilmiştir. Bütün dozlarda, cinsiyetler arası anlamlı bir fark görülmemekle birlikte, kombinasyon uygulamasında kadın %MI değerleri erkeklerinkinden daha düşük seyretmiştir (p > 0,05). Mitotik indeks değerlerinde, gerek kombinasyon gerekse tek başına PhI veya MMC uygulamalarında negatif veya solvent kontrole kıyasla cinsiyete göre karşılaşılan herhangi bir anlamlı değişiklik bulunmamaktadır.



Şekil 4.4. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Kromozom Aberasyonu (CA) testinin cinsiyete göre mitotik indeks (%MI) oranları.

Değerlendirilen kromozom aberasyon tiplerinin temsili ışık mikroskop fotoğrafları Şekil 4.5 de verilmiştir. Şekil 4.5'te kromozom ve kromatid gap adı verilen aberasyona ait temsili bir görüntü bulunmaktadır. Ok kromozom aberasyonlarını gösterir.



Şekil 4.5. İnsan lenfosit hücrelerinde gözlemlenen anormal kromozomların temsili mikroskop görüntüsü (1000x).

- A) Negatif kontrol; kromozomal gap adı verilen anomaliyi göstermektedir
B) 125 µg/ml PhI; kromozomal kırık adı verilen anomaliyi göstermektedir
C) 250 µg/ml PhI; kromozomal ring (halka) adı verilen anomaliyi göstermektedir
D) MMC; Siyah ok, kromozomal exchange (değişim) adı verilen anormalliği göstermektedir

4.2. *In vitro* Mikronükleus Test sonuçları

Bu çalışmada *in vitro* mikronükleus testi gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak tek başına Phl ve MMC'nin uygulandığı ve aynı zamanda MMC+Phl kombinasyonunun kullanıldığı 9 doz yer almıştır. Bu deney sonucunda, tüm deney gruplarına ait ortalama nükleer bölünme indeks (NDI) değerleri ve binükleer hücrelerde gözlemlenen mikronükleus oranları (MN) Çizelge 4.3, Şekil 4.6 ve 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testi ile elde edilen nükleer bölünme indeksi, mikronükleus ve nükleer anomalilerin sayısal değerleri.

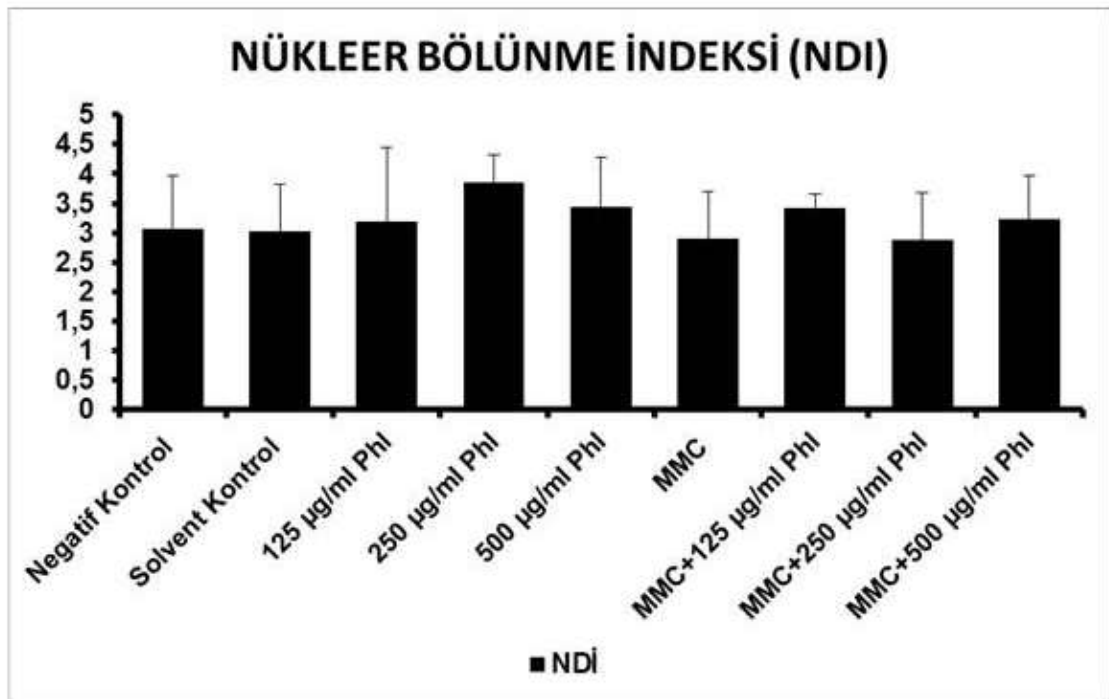
Doz	N	Nükleer Bölünme İndeksi (NDI)	MN	Nükleer Anomaliler ^a
Negatif Kontrol	4	3,06±0,91	6,85±6,50	42
Solvent Kontrol	4	3,03±0,79	9,62±7,18	41
125 µg/ml Phl	4	3,19±1,26	11,72±3,35	44
250 µg/ml Phl	4	3,85±0,47	14,4±3,06	78
500 µg/ml Phl	4	3,43±0,85	9,61±3,62	58
MMC	4	2,90±0,80	49,48±43,44	86
MMC + 125 µg/ml Phl	4	3,42±0,23	11,99±5,70	105
MMC + 250 µg/ml Phl	4	2,87±0,81	13,08±18,12	50
MMC + 500 µg/ml Phl	4	3,22±0,75	9,70±8,54	71

^aSayılan 2000 hücrede gözlemlenen mikronükleus dışındaki diğer nükleer anomalilerin (nükleer köprü + nükleus tomurcuklanması) toplamıdır.

Çizelge 4.3, insan periferik kanında Phl ve MMC'ye maruz kalan lenfositlerde gerçekleştirilen MN testi sonucunda yapılan mikroskopik gözlemlerde ortaya çıkan NDI, MN ve diğer nükleer anomalilerin sayımına ait verileri göstermektedir. Bu çizelgede bulunan NDI ve MN verilerinden yararlanarak Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki

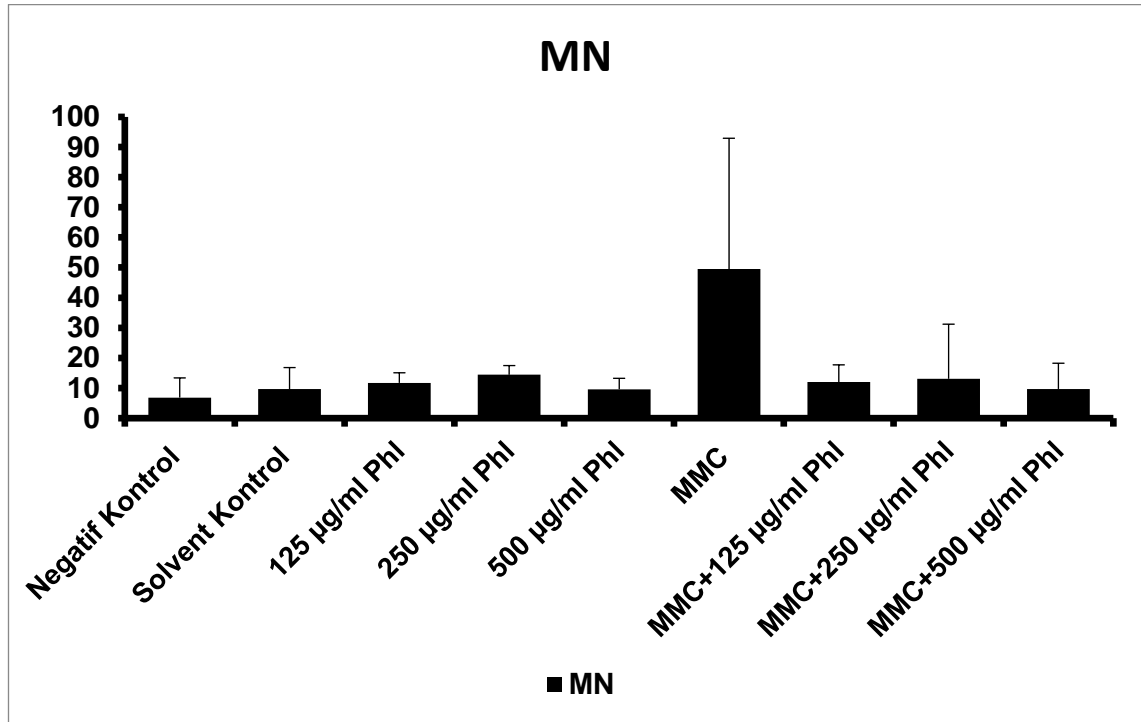
grafikler hazırlanmıştır. NDI verilerine, normalite testi uygulanarak parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Levene Testi sonucuna göre de Post Hoc analizlerinden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Uygulanan PhI dozları, negatif ve solvent kontrol arasında istatistiki anlamlı bir farklılık değerlendirilmemiştir ($p > 0,05$). Floridzinin her üç dozunun da NDI değerlerinde negatif kontrole göre anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği belirlenmiştir ($p > 0,05$). Negatif kontrol ve MMC arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). MMC ve PhI'nin üç dozunun kombinasyonlarının, NDI değerlerinde hem MMC'nin tek başına kullanıldığı gruba ve hem de negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiki anlamlı bir değişim yaratmadığı değerlendirilmiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.3'te verilen çekirdek anormallikleri değerlendirildiğinde, Floridzin tek başına uygulamasında insan lenfosit hücrelerinin çekirdeklerinde çekirdek bölünmesinde oluşan köprü ve çekirdek tomurcuklanması durumlarında doza bağlı bir artış olduğu dikkati çekmektedir. MMC tek başına ve MMC ile Floridzin kombinasyon uygulamalarının da çekirdek anormalliklerini negatif ve solvent kontrole kıyasla artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.6. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde elde edilen NDI oranları (%).

Şekil 4.7, Phl ve MMC'ye maruz kalan lenfositlerde gerçekleştirilen MN testi sonucunda binükleer hücrelerde gözlemlenen mikronükleus oranlarını (%) göstermektedir. MN verilerine normalite testi uygulanarak non-parametrik analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene Testi sonucuna göre de Post Hoc Testlerden Tamhane T2 Testi uygulanmıştır. Uygulanan Phl dozları ve solvent kontrol arasında istatistiki anlamlı bir farklılık değerlendirilmemiştir ($p > 0.05$). Phl'nin her üç dozunun da MN açısından negatif kontrole göre istatistiki anlamlı herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Negatif kontrol ve MMC ortalama değerleri arasında çarpıcı bir fark vardı ve bu nedenle MMC değerleri istatistiksel açıdan anlamlı görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca, Mitomisine kıyasla negatif kontrol, solvent kontrol, floridzin 500 mikrogram ve MMC + Phl'nin 500 µg/ml dozunun kombinasyonunun MN istatistiki anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN oranları (%o, p<0,05).

NDI değerleri ve MN oranlarında mikronükleus test sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımları çizelge 4.4 ve Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da gösterilmektedir. Cinsiyetin NDI ve MN üzerindeki etkileri two-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir.

Çizelge 4.4. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testi ile elde edilen nükleer bölünme indeksi, mikronükleus ve nükleer anomalilerin cinsiyete göre dağılımları.

Doz	Nükleer Bölünme İndeksi (NDI)		MN		Nükleer Anomaliler ^a	
	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
Negatif Kontrol	3,79±0,40	2,33±0,46	6,13±3,17	7,58±10,71	28	14
Solvent Kontrol	3,19±0,53	2,87±1,23	12,12±5,31	7,13±10,08	15	26
125 µg/ml Phl	3,35±1,58	3,04±1,47	13,78±4,08	9,66±0,20	17	27
250 µg/ml Phl	3,88±0,81	3,82±0,03	15,39±0,97	13,42±4,83	32	46
500 µg/ml Phl	3,17±1,37	3,69±0,08	8,57±5,88	10,64±0,71	16	42
MMC	2,74±0,49	3,07±1,24	75,59±53,41*†	23,37±9,04*†	42	44
MMC+125 µg/ml Phl	3,3±0,03	3,54±0,31	15,25±6,87	8,75±2,83	52	53
MMC+250 µg/ml Phl	2,60±0,70	3,15±1,08	6,03±8,53	20,14±26,71	11	39
MMC+500 µg/ml Phl	2,64±0,46	3,81±0,31	6,17±2,96‡	13,24±12,65‡	17	54

^aSayılan 2000 hücrede gözlemlenen mikronükleus dışındaki diğer nükleer anomalilerin (nükleer köprü + nükleus tomurcuklanması) toplamıdır.

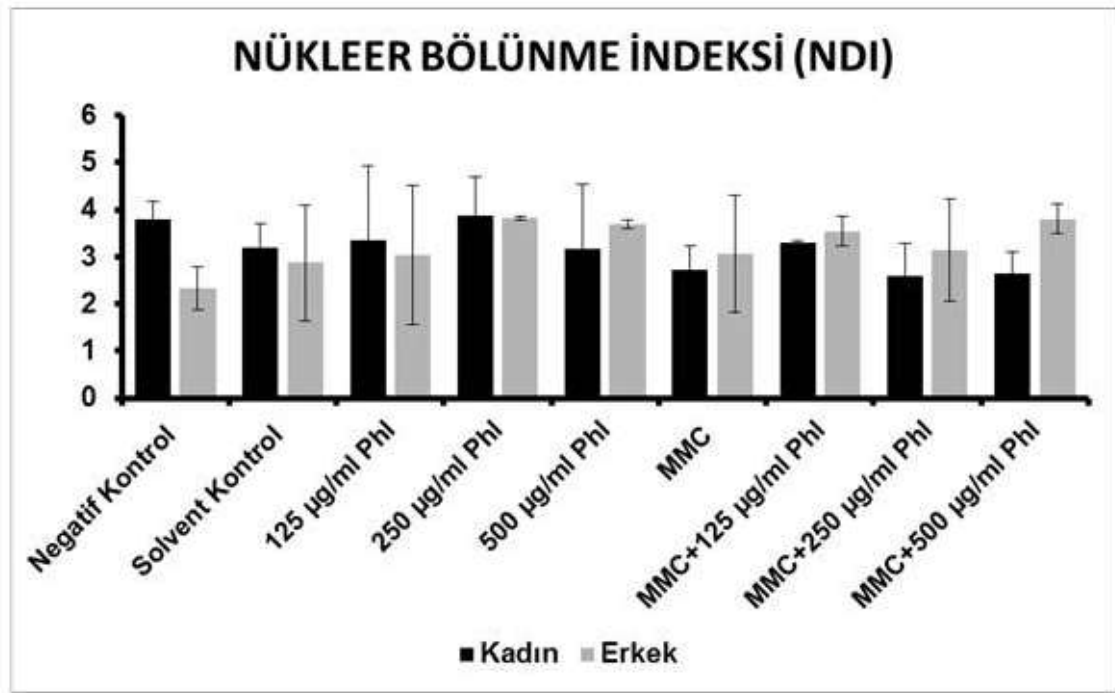
* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, *p < 0,05

† : Solvent kontrol grubu ile karşılaştırma, †p < 0,05

‡ : MMC doz grubu ile karşılaştırma, ‡p < 0,05

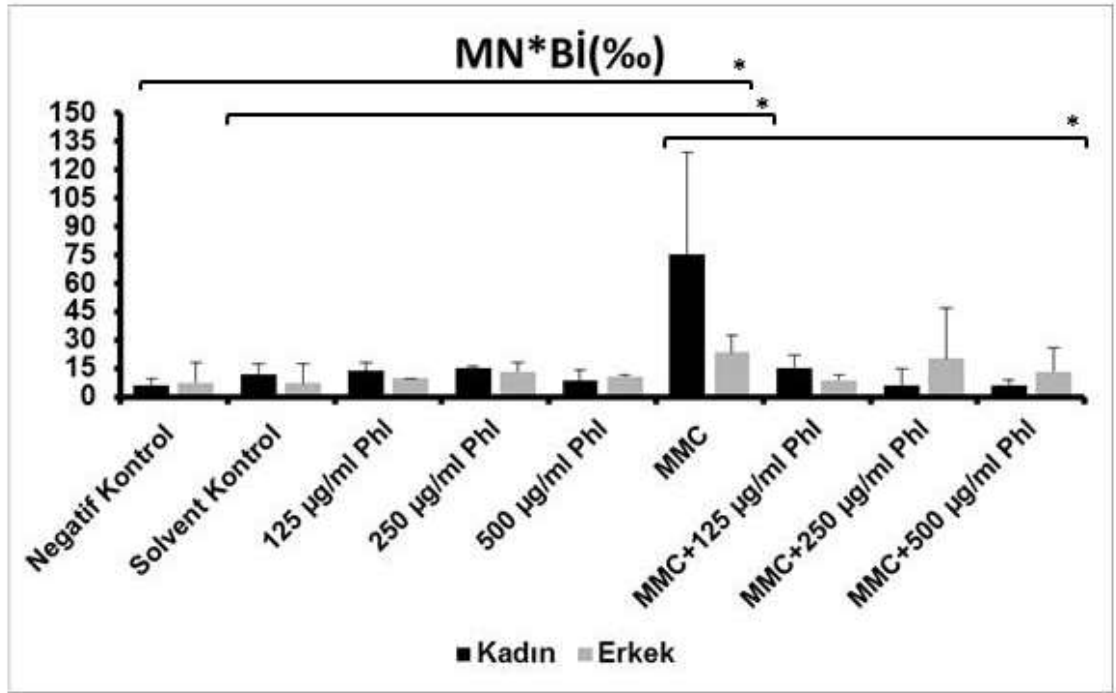
Yapılan Wilcoxon testine göre, cinsiyetin NDI üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi tespit edilmemiştir (Çizelge 4.4). Şekil 4.8’te gösterildiği gibi, erkeklerde tek başına Phl uygulamaları negatif kontrole kıyasla NDI değerlerinde anlamlı olmayan

küçük bir artış getirmiştir. Kadınlarda ise NDI değerleri negatif kontrole kıyasla Phl muamelesinde değişmemiştir. Kadın NDI değerlerinde özellikle MMC+Phl'nin 250 ve 500 µg/ml dozlarında negatif kontrole kıyasla küçük ve anlamlı olmayan bir azalma olduğu; benzer durumun erkekler için ise geçerli olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, NDI'da MMC+Phl kombinasyonu ve tek başına MMC uygulaması arasında bir anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.8. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde elde edilen NDI oranlarının cinsiyete göre dağılımı (%).

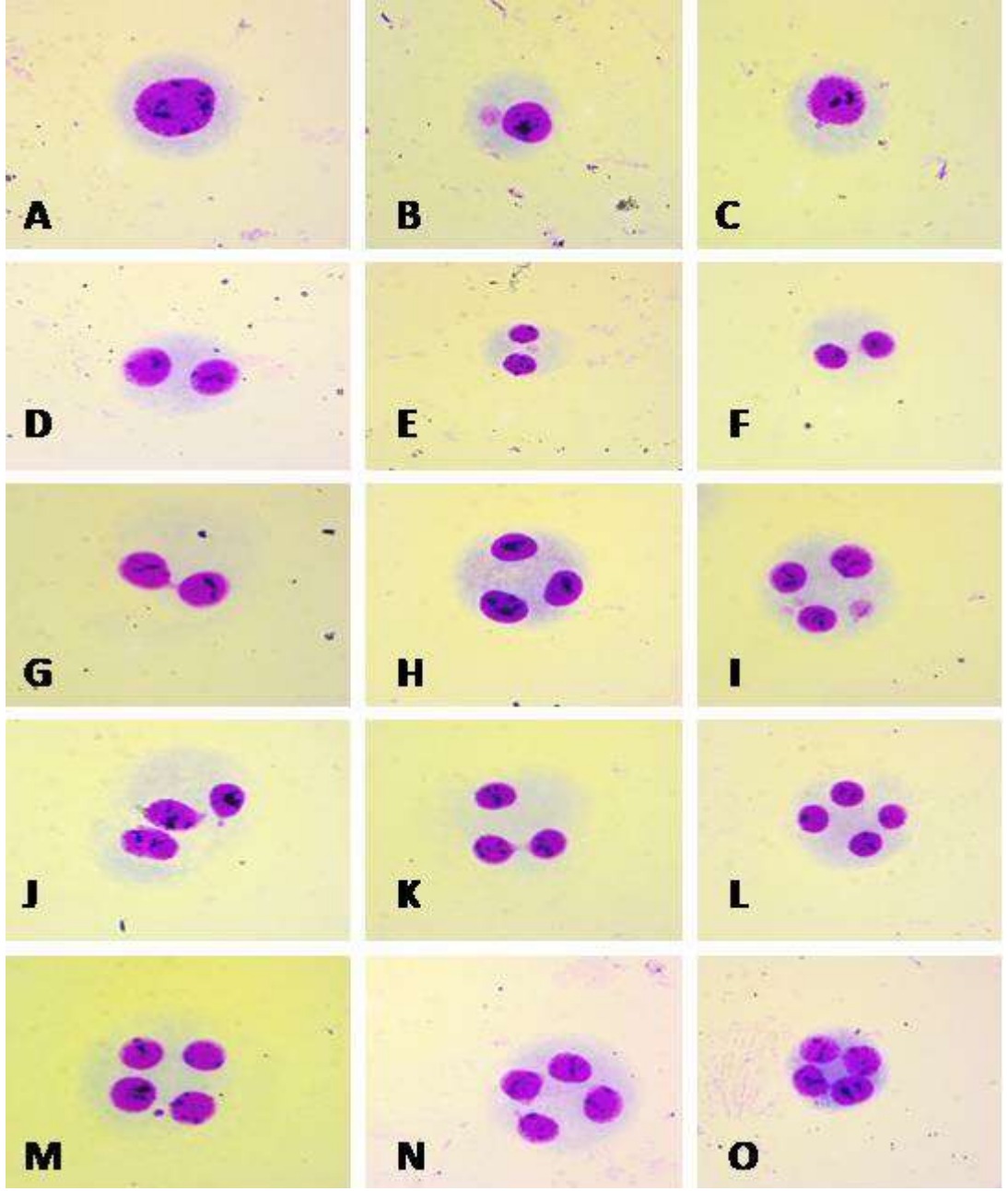
Şekil 4.9'da ise Phl, MMC ve Phl+MMC uygulamalarının ardından MN oranlarının cinsiyete göre dağılımları gösterilmiş ve verilere Wilcoxon testi uygulanmıştır. Negatif kontrol ve solvent kontrol arasında anlamlı bir fark gözlenmemekle birlikte; MMC değerleri, negatif ve solvent kontrole kıyasla cinsiyete göre anlamlı derecede bir farklılık göstermektedir ($p < 0,05$). İlaveeten, MMC+Phl 500 µg/ml dozunda MMC tek başına uygulandığında elde edilen MN oranları arasında cinsiyete göre anlamlı bir değişim olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). MN oranları açısından, Phl'nin tek başına uygulanması ve solvent kontrol arasında ise cinsiyete göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$).



*p < 0,05

Şekil 4.9. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Mikronükleus Testinde binükleer hücrelerde gözlemlenen MN oranlarının cinsiyete göre dağılımları (%).

Mikroskopik incelemeler sonucu gözlenen bazı MN ve diğer nükleer anomaliler fotoğraf çekilerek kaydedilmiştir. Kaydedilen örnekler arasında tek çekirdekli MN içeren ve içermeyen hücreler, çift çekirdekli hücreler MN içeren ve içermeyen hücreler ve polinükleer hücreler Şekil 4.10'da görselleştirilmiştir.



Şekil 4.10. Hücrelerin mikroskopik incelemelerinde gözlemlenen nükleus tomurcuklanması (bud) ve mikronükleus örneklerinin temsili görüntüleri (400x).

- A) Negatif kontrol, Hasarsız mononükleer hücre;
- B) Solvent kontrol, mikronükleuslu mononükleer bir hücre;
- C) MMC, nükleer bud mononükleer hücre;
- D) Negatif kontrol, Hasarsız binükleer hücre;
- E) 125 µg/ml Phl, Mikronükleuslu binükleer hücre;
- F) 250 µg/ml Phl, Bud ile binükleer hücre;
- G) 500 µg/ml Phl Köprü ile binükleer hücre;
- H) Solvent kontrol, Hasarsız trinükleer hücre;
- I) MMC+125 µg/ml Phl, Mikronükleuslu trinükleer hücre;

- J) MMC+ 250 µg/ml Phl, Bud ile trinükleer hücre;
- K) MMC+500 µg/ml Phl, Köprü ile trinükleer hücre;
- L) 125 µg/ml Phl, Hasarsız tetranükleer hücre;
- M) MMC, Mikronükleuslu tetranükleer hücre;
- N) MMC+250 µg/ml Phl, Bud ile tetranükleer hücre;
- O) MMC+500 µg/ml Phl, Köprü ile tetranükleer hücre;

4.3. Komet Testi (Tek hücre Jel Elektroforezi) Sonuçları

Bu deneyde komet testi yapılmış ve sonuç olarak tek başına Ph1 ve MMC'nin uygulandığı ve aynı zamanda MMC+Ph1 kombinasyonunun kullanıldığı 9 doz yer almıştır. Komet testi sonucunda elde edilen komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzaklığı, Olive moment uzaklığı ve kafa % DNA verileri Çizelge 4.5.'te, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verileri ise Çizelge 4.6.'da gösterilmektedir. Genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verileri cinsiyete göre bir değerlendirmesi ise Çizelge 4.7.'de yer almaktadır. Ayrıca, komet testinde incelenen her bir parametre için (komet alanı, yoğunluğu vd.) aşağıda ayrı grafikler oluşturulmuştur (Şekil 4.11-22).

Çizelge 4.5. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin ortalama değerleri

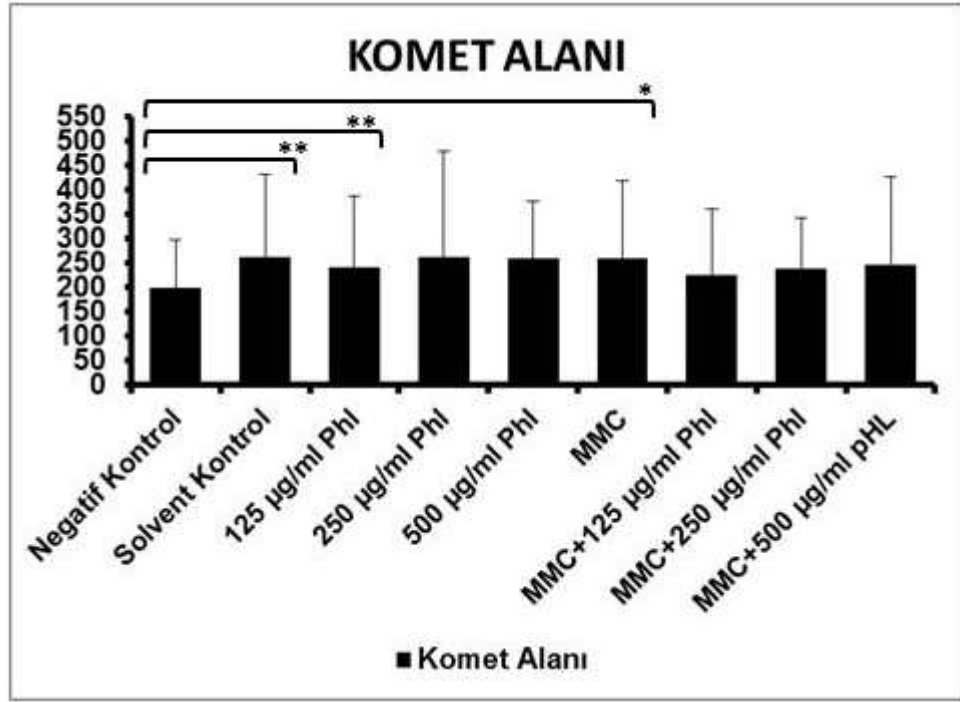
Doz (µg/ml)	N	Komet Alanı	Komet Uzunluğu (µm)	Komet yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk %DNA	Kuyruk Moment Uzaklığı (µm)	Olive Momenti (µm)	Kuyruk Kafa %DNA
Negatif Kontrol	200	198,90±98,06	19,22±5,37	18597,95±8870,83	2,76±0,92	2,47±0,80	8,80±2,31	0,23±0,06	97,54±0,79
Solvent Kontrol	200	261,16±172,13*	21,15±5,29	18891,26±10315,65	2,98±0,69	2,02±1,15	9,96±2,79*	0,29±0,21	97,98±1,15
125 µg/ml Phl	200	240,15±147,67**	21,15±5,29***	16879,00±9530,48	3,63±0,91***†††	3,26±1,62	9,80±2,60***	0,54±0,36	96,74±1,62
250 µg/ml Phl	200	263,69±216,65	22,31±8,60	16702,40±10604,91	4,33±2,47	3,43±2,78	10,21±3,96	0,59±0,65	96,57±2,78
500 µg/ml Phl	200	259,78±116,86	22,44±4,37*	18559,88±5542,14	3,77±1,02*	2,97±0,80	10,38±2,01*	0,44±0,21	97,78±1,48
MMC	200	260,23±159,26*	23,47±7,10*	15907,60±700,11	4,93±1,31	4,56±1,33	10,67±3,07**	0,61±0,27	95,43±1,33
MMC+125 µg/ml Phl	200	224,65±136,54	20,09±4,72	14608,94±5604,32*††	2,75±0,23	2,87±1,29	9,27±2,34	0,28±0,11	97,13±1,29
MMC+250 µg/ml Phl	200	237,92±104,97	22,17±5,34*	16107,30±5399,80	4,30±2,47*	3,47±1,86	10,17±2,46**	0,52±0,53	96,54±1,86
MMC+500 µg/ml Phl	200	246,28±181,62	21,15±7,77	16754,73±9512,53	3,45±1,57	3,52±1,12	9,73±3,54	0,42±0,16	96,48±1,12

* :Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

† :Solvent kontrol grubu ile karşılaştırma, †p < 0,05; ††p < 0,01; †††p < 0,001

Çizelge 4.5, insan periferik kanında Phl ve MMC'ye maruz kalan lenfositlerde gerçekleştirilen komet testi sonucunda jel elektroforezine tabi tutulan hücrelerde gözlemlenebilen hasarlı DNA'nın yoğunluğunu yazılım yardımı ile kantitatif biçimde göstermektedir. Komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kuyruk moment uzaklığı, Olive moment uzaklığı ve kafa % DNA verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene Testi sonucuna göre de post hoc analizlerinden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Çizelge 4.5'te belirtilen her parametreye dair bulgular, aşağıda adı geçen parametrelere ait şekillerle birlikte sunulmuştur (Şekil 4.11-18).

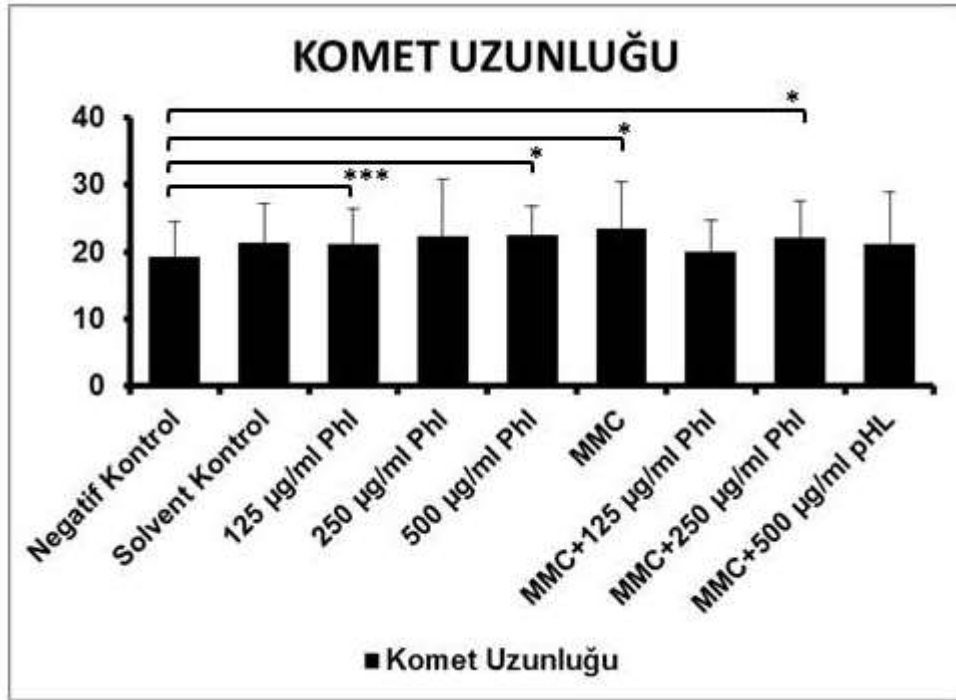
Şekil 4.11'de kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında komet alanının değişimi gösterilmiştir. Komet alanı verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Solvent kontrol, 125 µg/ml Phl ve MMC doz gruplarında komet alanı, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (sırasıyla $p < 0,005$; $p < 0,005$; $p < 0,05$). Diğer parametrelerde ise anlamlı herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir.



*p < 0,05; **p < 0,01;

Şekil 4.11. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Alanı değerleri.

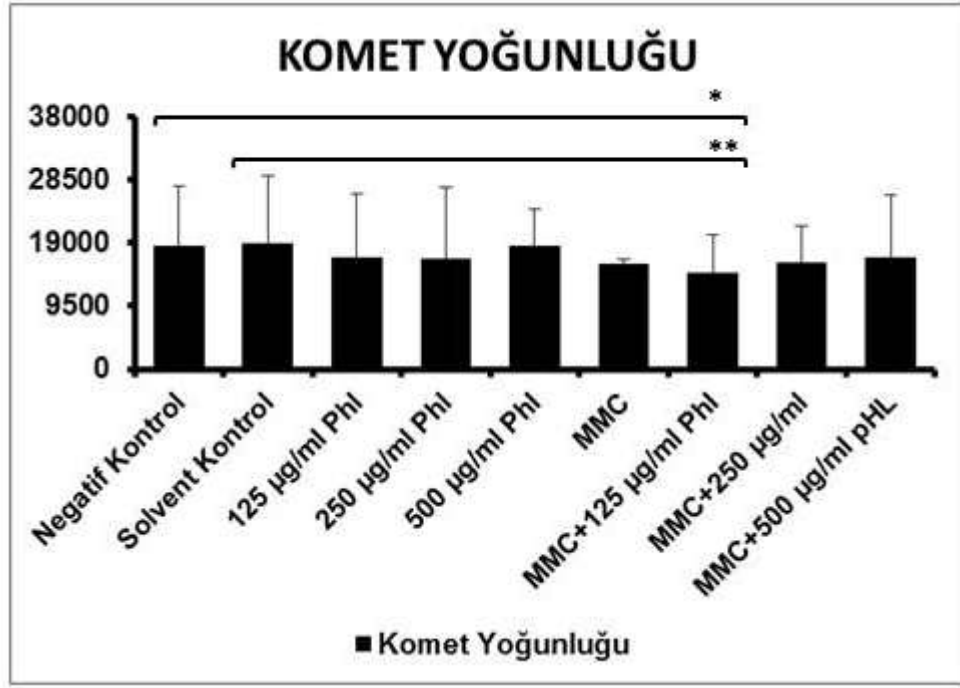
Şekil 4.12’de kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında komet uzunluğunun değişimi gösterilmiştir. Komet uzunluğu verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Buna göre, 125 ve 500 µg/ml Phl, MMC ve MMC+Phl 250 µg/ml doz gruplarında komet uzunluğu, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (sırasıyla p < 0,001; p < 0,05; p < 0,05; p < 0,05). Bunun dışında, solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir.



*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Şekil 4.12. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Uzunluğu değerleri.

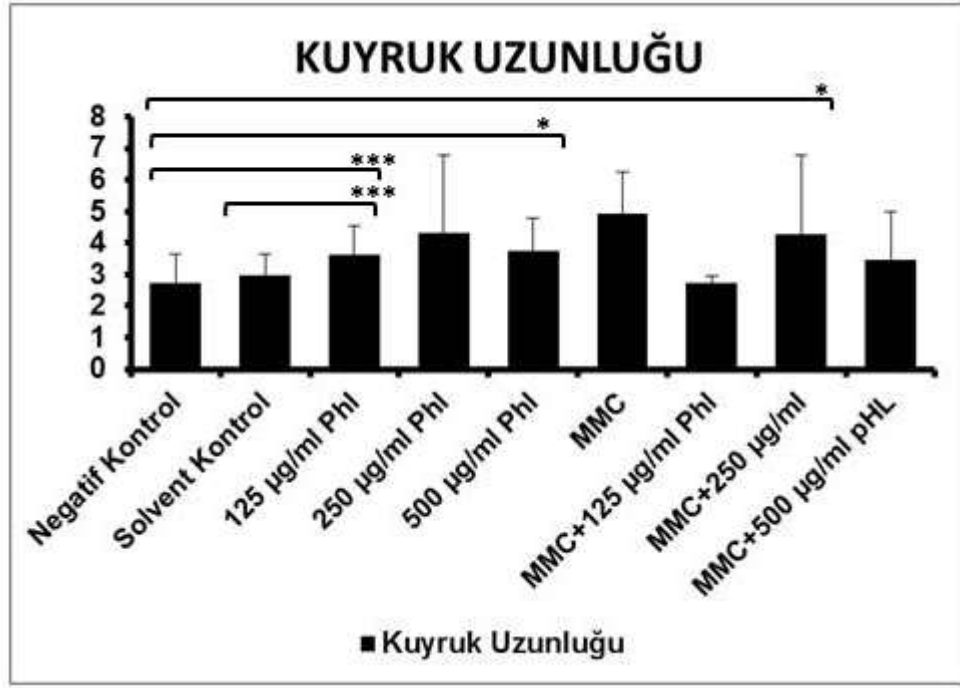
Şekil 4.13'te kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında komet yoğunluğu değişimi gösterilmiştir. Komet yoğunluğu verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. MMC+Phl 125µg/ml doz grubunda komet yoğunluğu, negatif kontrol ve solvent kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmüştür (sırasıyla p < 0,05; p < 0,01). Bunun dışında, negatif kontrol veya solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir.



*p < 0,05; **p < 0,01;

Şekil 4.13. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Komet Yoğunluğu değerleri.

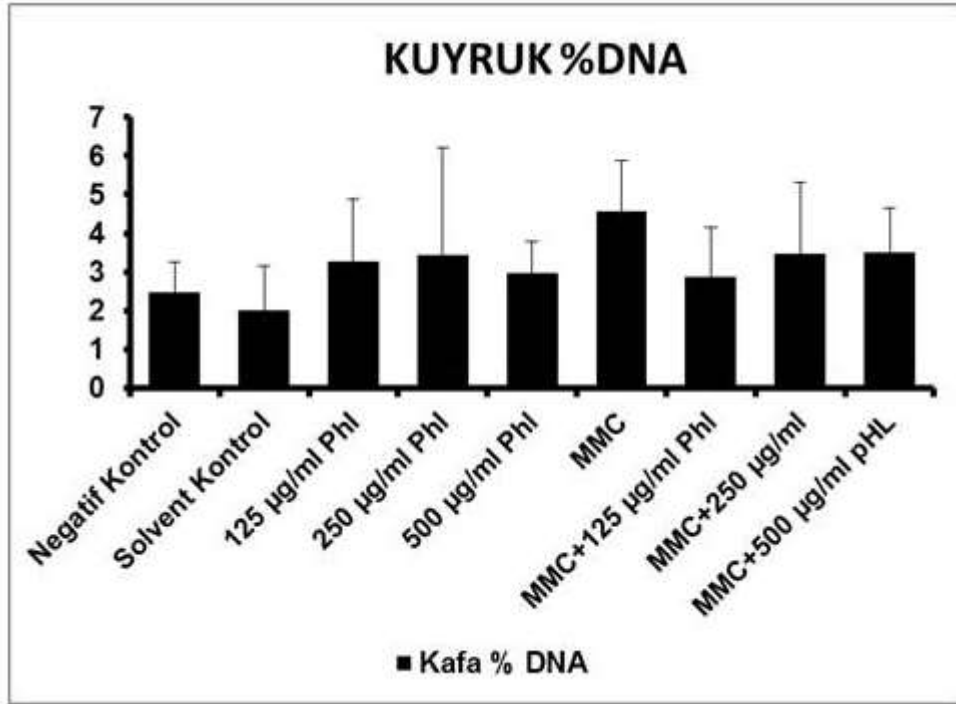
Şekil 4.14'te kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında kuyruk uzunluğunun değişimi gösterilmiştir. Kuyruk uzunluğu verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Buna göre, 125 ve 500 µg/ml Phl ve MMC+Phl 250 µg/ml doz gruplarında kuyruk uzunluğu, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (sırasıyla p < 0,001; p < 0,05; p < 0,05). Ayrıca, 125 µg/ml Phl dozunda kuyruk uzunluğunun solvent kontrol grubuna göre de yükselişi anlamlıdır (p < 0,001). Bunların dışında, tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir; ancak, MMC+Phl kombinasyonunda 125 µg/ml'den ve 250 µg/ml'ye yükselen konsantrasyon, kuyruk uzunluğunu da anlamlı derecede arttırmıştır (p < 0,05).



*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001;

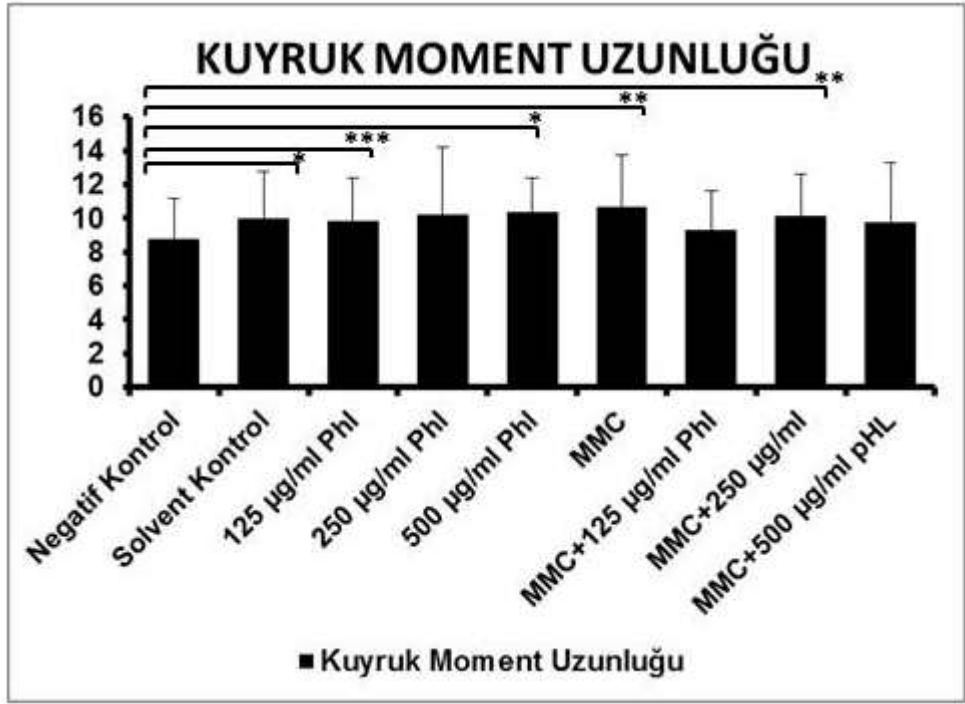
Şekil 4.14. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Uzunluğu değerleri.

Şekil 4.15'te kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında kuyruk % DNA değişimi gösterilmiştir. Kuyruk % DNA verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Buna göre, kuyruk % DNA için negatif kontrol veya solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında istatistiki anlamlı herhangi bir değişim kaydedilmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.15. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk % DNA değerleri.

Şekil 4.16'da kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında kuyruk moment uzunluğu değişimi gösterilmiştir. Kuyruk moment uzunluğu verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Solvent kontrol, 125 ve 500 µg/ml Phl, MMC ve MMC+Phl 250 µg/ml doz gruplarında kuyruk moment uzunluğu, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$). Bunun dışında, solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir.



*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

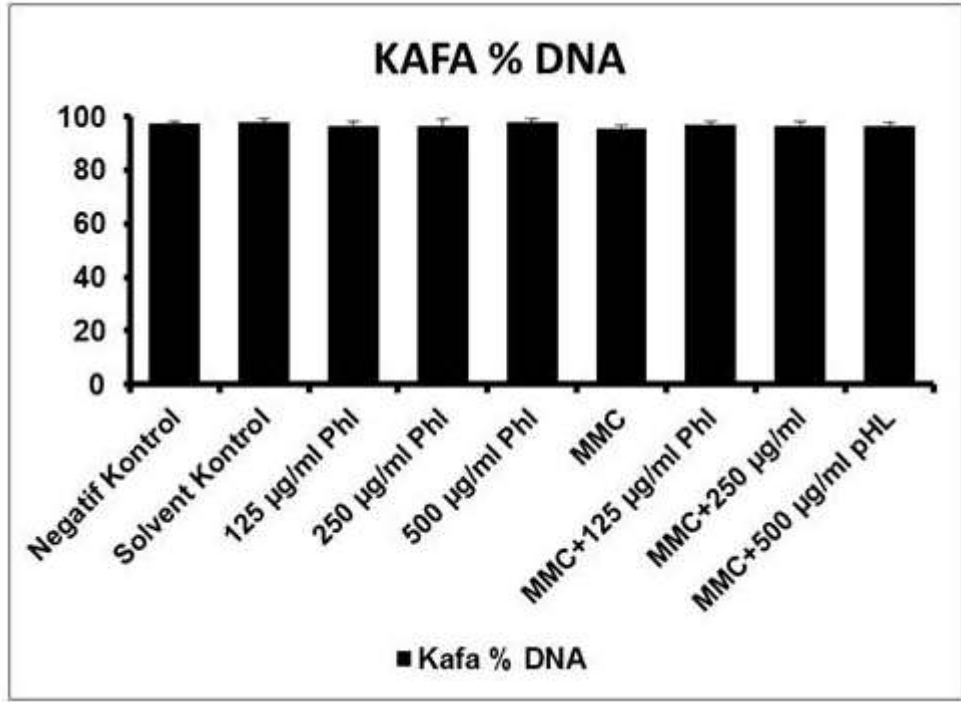
Şekil 4.16. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kuyruk Moment Uzunluğu değerleri.

Şekil 4.17’de kontrol grupları ile birlikte tek başına Phl ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında Olive kuyruk momenti değişimi gösterilmiştir. Olive kuyruk momenti verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Buna göre, Olive kuyruk momenti için negatif kontrol veya solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+Phl kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir değişim kaydedilmemiştir (p >0,05).



Şekil 4.17. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Olive Kuyruk Momenti değerleri.

Şekil 4.18’de kontrol grupları ile birlikte tek başına PhI ve MMC doz grupları ve bunların kombinasyonları uygulandığında kafa % DNA değişimi gösterilmiştir. Kafa % DNA verilerine, normalite testi uygulanarak non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene testi sonucuna göre post hoc analizlerden Tamhane T2 testi uygulanmıştır. Buna göre, kafa % DNA için negatif kontrol veya solvent kontrol ile diğer doz grupları arasında ve tek başına MMC uygulaması ve MMC+PhI kombinasyon grupları arasında anlamlı herhangi bir değişim kaydedilmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.18. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinin Kafa % DNA değerleri.

Şekil 4.19 ve 4.20 ile ilgili bulgular yukarıda Çizelge 4.6 açıklanırken detaylı biçimde verilmiştir. Şekil 4.19 ve 4.20, Çizelge 4.6’da bulunan değerlerin sütun grafik şeklinde ifade edilmesi amacıyla oluşturulmuştur.

Çizelge 4.6. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi ortalama değerleri.

Doz ($\mu\text{g/ml}$)	N	Genetik Hasar İndeksi	Hasarlı Hücre Yüzdesi
Negatif Kontrol	4	0,15 \pm 0,07	0,02 \pm 0,03
Solvent Kontrol	4	0,16 \pm 0,10	0,02 \pm 0,02
125 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,23 \pm 0,05	0,03 \pm 0,01
250 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,25 \pm 0,20	0,05 \pm 0,08
500 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,25 \pm 0,14	0,04 \pm 0,04
MMC	4	0,52 \pm 0,18* \dagger	0,10 \pm 0,07
MMC + 125 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,17 \pm 0,05‡	0,01 \pm 0,01
MMC + 250 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,30 \pm 0,26	0,08 \pm 0,10
MMC + 500 $\mu\text{g/ml}$ Phl	4	0,29 \pm 0,10	0,06 \pm 0,02

* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, * $p < 0,05$

\dagger : Solvent kontrol grubu ile karşılaştırma, $\dagger p < 0,05$

‡ : MMC doz grubu ile karşılaştırma, ‡ $p < 0,05$

Çizelge 4.5'te sunulan hücelere ait verilerden yararlanarak genetik hasar indeksi (GHİ) ve hasarlı hücre yüzdesini (HHY) gösteren Çizelge 4.6 hazırlanmıştır. GHİ ve HHY verilerine normalite testi uygulanarak non-parametrik analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Levene Testi sonucuna göre de post hoc testlerinden Tukey HSD testi GHİ için, Tamhane T2 testi HHY için uygulanmıştır. GHİ'de, uygulanan Phl dozları ve solvent kontrol arasında istatistiki anlamlı bir farklılık değerlendirilmemiştir; ancak, solvent kontrole kıyasla Phl ortalama değerlerinde küçük bir artış mevcuttur. Ayrıca, Phl'nin her üç dozunun da GHİ açısından negatif kontrole göre istatistiki anlamlı herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Buna karşın, negatif ve solvent kontrol grupları ile MMC grubunda elde edilen GHİ değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Solvent kontrol ile tek başına Phl'nin dozları kıyaslandığında GHİ değerlerinde anlamlı bir değişime rastlanmamıştır. Ayrıca, MMC + Phl'nin 125 $\mu\text{g/ml}$ kombinasyonunun GHİ değerlerinde, tek başına MMC doz grubundakine kıyasla anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). HHY'de ise hiç bir doz grubu arasında anlamlı bir değişime

rastlanılmamıştır ($p > 0,05$). HHY’de doz gruplarına ait ortalamalar değerlendirildiğinde ise Phl’nin tek başına negatif ve solvent kontrole kıyasla küçük bir artışa neden olduğu; MMC’nin ise negatif ve solvent kontrole göre daha yüksek bir artış kaydettiği görülmüştür. MMC+Phl’nin 125µg/ml kombinasyonu HHY’yi dramatik biçimde düşürmüştür; ancak, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir.

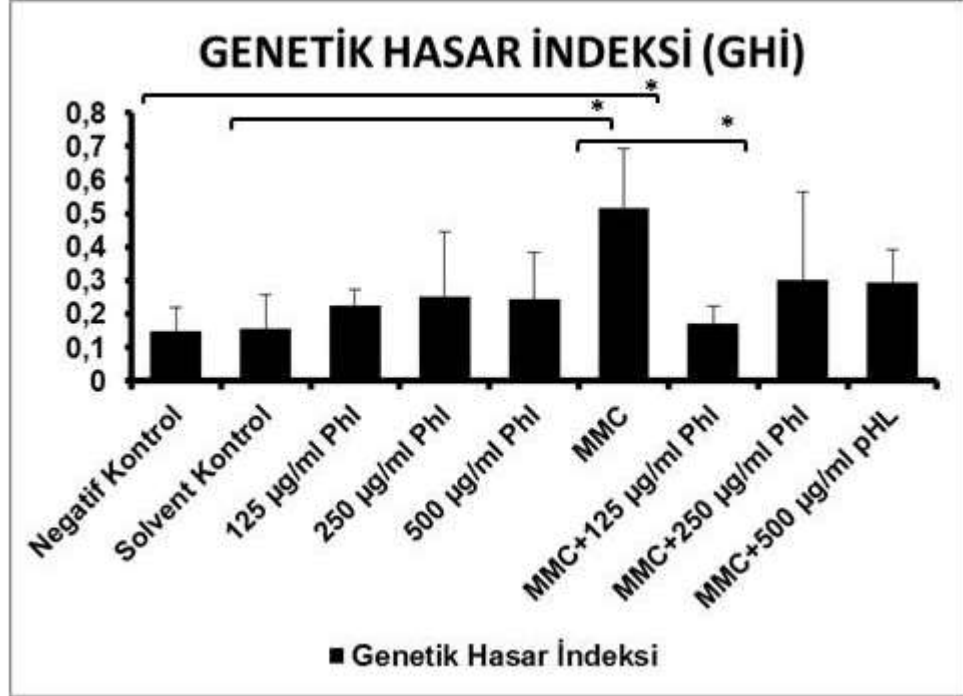
Çizelge 4.7. Floridzin uygulaması sonucunda gerçekleştirilen Komet Testinin Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi cinsiyete göre dağılımları.

Doz (µg/ml)	N	Genetik Hasar İndeksi (GHİ)		Hasarlı Hücre Yüzdesi	
		Kadın	Erkek	Kadın	Erkek
Negatif Kontrol	4	0,18±0,08	0,12±0,06	0,04±0,03	0,00±0,00
Solvent Kontrol	4	0,18±0,11	0,13±0,10	0,03±0,03	0,01±0,01
125 µg/ml Phl	4	0,21±0,07	0,24±0,03	0,02±0,00	0,04±0,00
250 µg/ml Phl	4	0,39±0,18	0,11±0,04	0,06±0,10	0,00±0,00
500 µg/ml Phl	4	0,35±0,10	0,14±0,06	0,08±0,06	0,02±0,03
MMC	4	0,62±0,23*†	0,41±0,01*†	0,10±0,10	0,06±0,06
MMC + 125 µg/ml Phl	4	0,19±0,04	0,15±0,07	0,07±0,00	0,01±0,01
MMC + 250 µg/ml Phl	4	0,39±0,41	0,21±0,10	0,01±0,01	0,04±0,03
MMC + 500 µg/ml Phl	4	0,32±0,14	0,27±0,07	0,04±0,01	0,05±0,01

* : Negatif kontrol grubu ile karşılaştırma, * $p < 0,05$

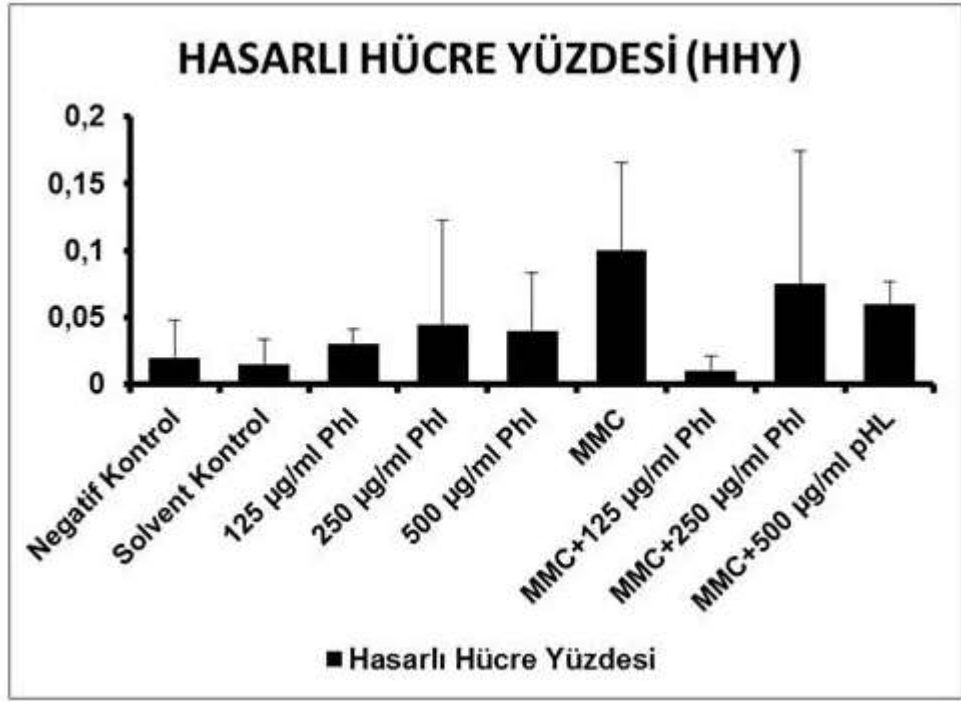
† : Solvent kontrol grubu ile karşılaştırma, † $p < 0,05$

GHİ ve HHY değerlerinde komet test sonuçlarının cinsiyetlere göre dağılımları çizelge 4.7’te gösterilmektedir. Cinsiyetin GHİ ve HHY üzerindeki etkileri two-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. GHİ’de yapılan analize göre tek başına Phl uygulamasında kadınlara ait ortalama değerler, bütün dozlarda negatif ve solvent kontrolün üzerinde olmuştur. Erkeklerde ise sadece 125 µg/ml Phl’de belirgin bir farklılık görülmüştür. Ancak hem kadınlar hem erkeklerdeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Bununla beraber, GHİ’de MMC ile negatif ve solvent kontrol arasında cinsiyetlere göre bir etkileşim olduğunu gösteren anlamlı bir değişim olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). MMC+Phl kombinasyonunun tüm dozları negatif veya solvent kontrol ile kıyaslandığında ise GHİ’de cinsiyete göre herhangi bir anlamlı değişim olmadığını göstermektedir. HHY açısından yapılan değerlendirmeye göre ise tek başına Phl, MMC uygulamaları ve bunların kombinasyonu negatif ve solvent kontroller ile kıyaslandığında cinsiyete göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Aynı durum, MMC+Phl kombinasyon dozları, tek başına MMC doz grubu ile karşılaştırıldığında da geçerli olmuştur.



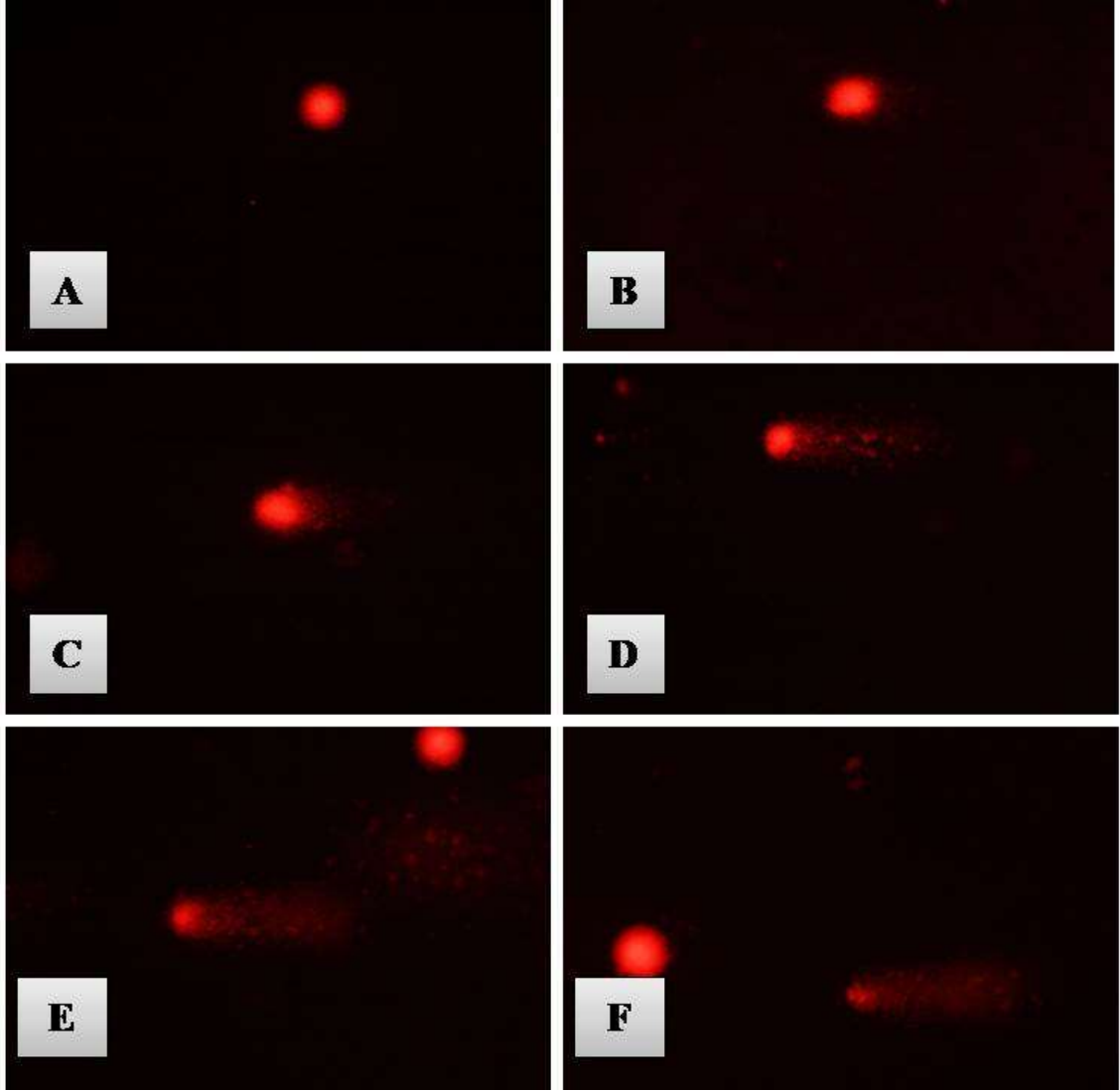
* $p < 0,05$

Şekil 4.19. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Genetik Hasar İndeksi değerleri.



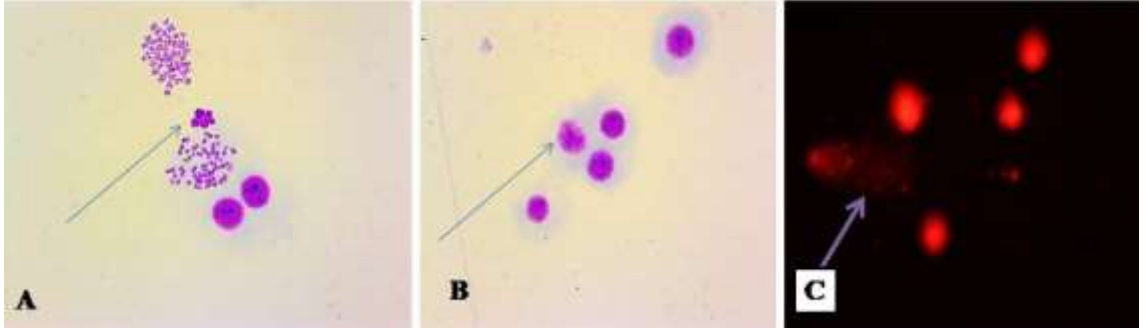
Şekil 4.20. Floridzin uygulaması ile gerçekleştirilen Komet Testinde elde edilen Hasarlı Hücre Yüzdesi değerleri.

Floresans mikroskopi ile gözlemlenen hücelere ilişkin bazı temsili fotoğraflar Şekil 4.21’de verilmiştir. Hücrelerin GHİ değerlerinin belirlenmesinde, Şekil 4.21’de gösterilen DNA hasar şiddetinin değişimi esas alınmıştır.



Şekil 4.21. İnsan lenfositlerinde hasarlı DNA varlığı ile gözlemlenen Komet oluşumlarının sınıflandırılması. DNA hasarı, insan lenfosit hücrelerinde DNA kuyruk alanı (%) ve komet kuyruk uzunluğu (DNA başının merkezinden DNA kuyruğunun sonuna kadar) olarak hesaplanır. DNA kuyruk alanı (%) veya DNA kuyruk uzunluğu ne kadar yüksekse hasar o derecede anlamlı olur. Tip 0'da DNA hasarı yoktur; Tip 1-4 ve apoptotik hücrede ise DNA hasarı giderek artmaktadır. A) Negatif kontrol, Hasarsız hücre; B) Solvent kontrol, Tip 1; C) 125 µg/ml Phl, Tip 2; D) 500 µg/ml Phl, Tip 3; E) MMC, Tip 4; F) MMC+250 µg/ml Phl, Apoptotik hücre.

Phl-DHA'nın neden olduğu hücre ölümü, apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini inceleyerek ayrıca değerlendirildi. Halihazırda, bizim çalışmamızda, Phl-MMC ile muamele edilmiş lenfositler, faz kontrast ışık mikroskobu altında gözlemlendiğinde, hücre büzülmesi, zar kabarması ve apoptotik (Şekil 4.22) cisimlerin oluşumu gibi apoptozun belirgin özelliklerini göstermiştir.



Şekil 4.22. A) Apoptotik cisimler (CA); B) Apoptotik hücre (MN); C) Apoptotik hücre (CT)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarih boyunca insanlık, bitki kullanımı ile genel sağlık arasındaki ilişkinin her zaman farkında olmuştur. Kanıtlar, bitkilerin temel biyoaktif kimyasallarının antibakteriyel, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, anti-oksidan ve anti-kanser aktivitelere sahip olduğunu gstermektedir (Dimas ve ark., 2012; Paraschos ve ark., 2012; Giaginis ve Theocharis, 2011). Son yıllarda anti-kanser ilaçlara karşı koruyucu etkilerinden dolayı bitki kaynaklı ürünlere ilgi artmaktadır (Maatouk ve ark., 2017). Bitkilerin geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde önemli etkilere sahip oldukları gsterilmiştir.

Diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların en sık karşılaşılan ölüm nedenlerinden oldukları uzun yıllardır kaydedilmektedir. Araştırmalar meyve, sebze ve bitkilerin kronik hastalıklara karşı koruyucu işlevini ortaya koymaktadır (Yamada ve ark., 2011; Mursu ve ark., 2014). Bu önemli fonksiyon, fitokimyasal bileşenlere atfedilmektedir. Fitokimyasalların koruyucu etkileri, anti-oksidatif aktiviteleri ile ilgilidir. Yüksek miktarda ROS üretiminin bir sonucu olarak çeşitli hastalıkların ortaya çıktığı bu süreçte, antioksidan özellikteki fitokimyasallar engelleyici işlev gstermektedirler (Zhang ve ark., 2015; Kruk, 2014).

Yapılan araştırmalar arasında, elma tüketiminin ciddi kronik hastalıkların azaltılmasında kritik bir faktör olarak sunulduğu görölmektedir (Hyson, 2011). Elma tüketiminin hastalıkları azaltmadaki potansiyelinin, yüksek antioksidan aktivite, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını engelleme, vücuttaki kolesterolü düşürme ve hatta lipitlerin oksidasyonunu engellemeye bağlı olduğu gsterilmiştir (Avcı ve ark., 2007; Amaffei ve ark., 2007). Elmanın yüksek fitokimyasal içeriğinden dolayı anti-kanser, anti-oksidan (Shehzadi ve ark., 2020) ve anti-genotoksik aktiviteye sahip bileşenleri barındırdığı ortaya konmuştur (Izquierdo-Vega ve ark., 2017). Bununla birlikte, elmada bulunan fitokimyasalların etkileşim mekanizmaları ve şekli hala araştırmacılar tarafından araştırılan bir konudur. Fitokimyasallar hakkındaki araştırmaların artması, sağlık anlamında bu moleküllerden daha yüksek bir oranda yararlanma fırsatı anlamına gelmektedir. Elmalardaki fitokimyasalların konsantrasyonları, elma çeşitidi ve çevresel koşullara bağlı olarak değişir. Elmalar, başlıca Malus türlerinde bulunan bir flavonoid

olan Floridzin açısından zengindir (Vasantha ve Yasmin, 2010). Floridzin çeşitli araştırmalarda hipoglisemik, anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-genotoksik ve anti-kanser özellikleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve araştırmalarda kullanılmıştır (Gosch ve ark., 2010). Phl konsantrasyonu, yapraklarda, kabuklarda veya meyvelerde ve ağaç kabuklarında yoğunlaşmaktadır (Gosch ve ark., 2010). Floridzin, antimikrobiyal, anti-kanser, anti-oksidan ve diğer faydalı sağlık özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür (Vlastos ve ark., 2015). Sonuç olarak, elma da dahil olmak üzere meyve ve sebzeler, kronik hastalıkları önlemede ve sağlıklı bir yaşamın sürdürülmesinde kilit faktörlerdir; dolayısıyla, sağlıklı bir diyetin parçası olarak düzenli tüketilmelidirler (Boyer ve Liu, 2004).

Farklı flavonoidlerin genotoksik/anti-genotoksik aktivitesine odaklanan bir takım çalışmalar vardır; ancak Floridzin'in insanlarda hücresel seviyedeki genotoksik etkileri hakkında kısıtlı veri bulunmaktadır. Bunun yanında, potansiyel bir anti-genotoksik flavonoid olan Phl'nin anti-genotoksitesite üzerine sadece birkaç çalışma odaklanmıştır. HepG2 hücreleri, bu araştırma için temsili hücre dizisi olarak seçildi çünkü bu karaciğer kanseri hücreleri, floridzin yağ asidi esterleri tarafından öldürülmeye duyarlıydı. Fonksiyonel olarak aktif p53 proteinine, yetkin DNA-onarım sistemine, *in vivo* ve *in vitro* genotoksitesite için yüksek bir tahmin verebilen faz-I ve -II metabolizması için aktif enzimlere sahiptir (Nair ve Rupasinghe, 2014).

Bu çalışmada, Floridzin'in olası genotoksik/anti-genotoksik özelliklerinin belirlenmesi ve ayrıca, Phl'nin genotoksik bir ajan olan Mitomisin C (MMC) ile kombinasyon şeklinde kullanılarak anti-genotoksik aktivite potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, insan periferik kanından kültüre edilen lenfositlerde kromozom aberasyon testi, mikronükleus testi ve komet testi gerçekleştirilerek Phl'nin genotoksik/anti-genotoksik özellikleri değerlendirilmiştir. Öte yandan, anti-kanser kemoterapötik bir ajan olarak kullanılan MMC, tek başına ve floridzin ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. MMC, tedavilerde tek başına kullanıldığında *in vitro* koşullarda güçlü bir oksidatif ve DNA hasar indükleyicisi olarak bilinmektedir (Wolters ve ark., 2021).

Bu çalışmada Mitomisin C'nin (MMC) genotoksik etkisi üç farklı testte gösterilmiştir. 0,25 µg/ml olarak belirlenen MMC konsantrasyonu ile kromozom aberasyonu, mikronükleus testi ve komet testleri uygulanmıştır. İnsan kan lenfositlerinde MMC muamelesi, daha yüksek toplam aberasyon ve daha düşük nükleer bölünme ile sonuçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler Mitomisin C'nin genotoksik etkiler oluşturduğunu göstererek önceki literatür verilerini (Bzeouich ve ark., 2016) desteklemiştir. Sonuç olarak, MMC'nin lenfosit hücreleri üzerine genotoksik bir ajan olarak hareket ettiği kabul edilmektedir.

Kromozom aberasyon sonuçları değerlendirildiğinde, tek başına Phl (125, 250 ve 500 µg/ml) ve MMC (0,25 µg/ml) dozlarının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde kromozom aberasyonu yaratmadığı tespit edilmiştir. Buna karşın, MMC+Phl kombinasyonlarının tüm dozlarında hem negatif hem de solvent kontrole kıyasla anlamlı derecede kromozom aberasyonu yarattığı gözlenmiştir. Phl'nin MMC ile kombine edildiğinde kromozom aberasyonlarını arttırması, bu molekülün anti-genotoksik etki gösterme potansiyelinin düşük olduğunu düşündürmektedir. Mitotik indeks verileri incelendiğinde istatistiksel anlamlı bir değişim görünmemekle birlikte ortalama değerler artan Phl konsantrasyonlarıyla yükselmiş, MMC+Phl kombinasyonunda ise artan konsantrasyonlarda düşmüştür. Proliferasyonla ilişkili diğer bir parametre olan NDI verilerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemekle birlikte ortalama Phl dozları negatif veya solvent kontrole kıyasla %MI değerlerinde gözlemlendiği gibi yüksektir; ancak, MMC+Phl kombinasyonunda ortalama NDI değerleri, negatif veya solvent kontrol grubu değerlerinin üzerinde seyretmektedir. Dolayısıyla, artan Phl dozlarının hücre proliferasyonuna olumlu etki ettiği belirtilebilir, fakat MMC+Phl kombinasyonunda %MI ve NDI verilerinin uyumlu olmaması nedeniyle bu kombinasyonun hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini yorumlamak güçleşmiştir.

Total CA, %MI, NDI, MN, GHİ ve HHY verilerinde, her bir uygulama grubu kendi içinde cinsiyet bazında Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. Ancak cinsiyetler arasında uygulamanın yarattığı anlamlı bir fark bulunamamıştır. MN testi sonuçlarına göre, donörler cinsiyete göre gruplandırılmadıklarında Phl, MMC ve MMC+Phl uygulamalarında MN değerlerinde anlamlı bir değişim gerçekleşmediği görülmektedir.

Tek başına MMC uygulamasının ortalama değeri solvent kontrolün yaklaşık 5 katı olmasına rağmen standart sapmanın yüksek olması nedeniyle anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. Buna karşın, yukarıdaki paragrafta belirtildiği gibi cinsiyete göre dağılımlar incelendiğinde tek başına MMC uygulamasının solvent kontrol karşısında MN oranını anlamlı seviyede artırdığı görülmüştür. Bununla beraber, MMC ve 500 µg/ml Phl kombinasyonunun ise MMC tarafından indüklenen genotoksik etkiyi anlamlı derecede düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer kombinasyon dozlarında da ortalama değerlerin tek başına MMC uygulamasında göre azaldığı gözlenmiştir, fakat bu dozlarda istatistiksel anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ayrıca, tek başına Phl uygulaması da MN oranını anlamlı miktarda değiştirmemiştir. Bu sonuçlar, cinsiyete dayalı bir değerlendirme yapıldığında, Phl'nin en azından belirli bir kombinasyonunda, antigenotoksik etkiye sahip olabileceğini işaret etmektedir.

Yalnızca, donörler cinsiyete göre gruplandırıldığında total CA, MN ve GHİ değerlendirmelerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı değişimler kaydettikleri gözlenmiştir. Toplam donör sayısı ile total CA değerlendirildiğinde MMC+Phl kombinasyonlarının tüm dozlarında negatif ve solvent kontrol gruplarına göre anlamlı bir yükseliş görülmesine benzer şekilde cinsiyetler ayrı olarak değerlendirildiğinde sadece negatif kontrol grubuna kıyasla total CA sayısında anlamlı bir yükseliş göstermişlerdir. Bunun yanında, cinsiyete göre gruplama yapıldığında, MN ve GHİ değerleri tek başına MMC uygulamasında negatif ve solvent kontrole kıyasla artmıştır. MMC'nin genotoksik karakteri göz önüne alındığında bu beklenen bir sonuçtur ve toplam donör sayısı ile GHİ ölçüldüğünde aynı sonuca varılmıştır (Çizelge 4.3.2); fakat, toplam donör sayısı ile MN ölçümü, MMC ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık üretmemiştir. Dolayısıyla, MN testinde elde edilen cinsiyete göre dağılım çizelgesinin (Çizelge 4.2.2), GHİ sonuçlarıyla uyumlu olması nedeniyle MMC'nin genotoksik etkilerini daha isabetli yansıttığı söylenebilir.

Komet testinin değerlendirilmesinde oluşan komete ait alan, kuyruk uzunluğu vd. parametreler detaylı bilgi sunarken GHİ ve HHY gibi parametreler de gerçekleştirilen uygulamanın DNA hasar yapıcı etkisinin daha belirgin biçimde anlaşılmasını sağlarlar. Çeşitli komet parametrelerinin ifade edildiği Çizelge 4.3.1'de tek başına 125 ve 500 µg/ml Phl, MMC dozları ve MMC+Phl'nin 125 ve 250 µg/ml dozları negatif kontrole

kıyasla anlamlı değişim göstermişlerdir. Ancak, bu farklılıklar solvent kontrol karşısında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmediğinden üzerinde durulmamıştır. Solvent kontrole kıyasla, 125 µg/ml Phl dozu komet kuyruk uzunluğunu arttırmış, aynı dozun MMC ile kombinasyonu ise komet yoğunluğunu düşürmüştür. Bu kombinasyonda komet yoğunluğu, ortalama değerler açısından tek başına MMC uygulamasına göre de düşüş kaydetmektedir; ancak, bu azalma anlamlı bulunmamıştır. Komet testi sonuçlarının kümülatif olarak yorumlanabileceği GHİ verileri dikkate alındığında ise MMC'nin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında DNA hasarını anlamlı derecede indüklediği, bununla beraber MMC'nin 125 µg/ml Phl ile kombinasyonunda indüklenen DNA hasarının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir. Hatta elde edilen değer, solvent kontrol değerine oldukça yakındır. GHİ, tek başına Phl dozlarının tamamında anlamlı derecede olmasa da yükselmiştir. Bu tablo, elde edilen total CA ve MN değerleriyle uyumludur. Bunun yanı sıra, MMC+Phl kombinasyonunun diğer dozlarında da (250 ve 500 µg/ml) GHİ anlamlı derecede olmasa da düşmüştür.

Phl'nin MMC üzerindeki koruyucu etkileri, büyük olasılıkla serbest radikal süpürücü aktivitesi nedeniyle kromozomal hasarlara neden olabilir (Gosch ve ark., 2010). Çalışmamız Phl'nin anti-genotoksik özellikler barındırdığını göstermiştir. Phl'nin MMC'ye karşı genoprotektif özellikleri, anti-oksidan aktivitelere ve lipidperoksidasyonu üzerindeki inhibitör etkisine bağlanabilir (Maatouk ve ark., 2018).

Önceki bir çalışmaya benzer şekilde, Phl'nin dokosaheksaenoat asit (DHA) ile birlikte tek başına Phl veya DHA değerlerine kıyasla yüksek anti-genotoksik özellikler sergilediği gösterilmiştir. İnsan hücreleri Jurkat T-ALL ve K562 üzerinde yapılan çalışmadan, Phl-DHA'nın hücre canlılığını ve ATP seviyelerini azalttığı, hücre içi LDH salınımını arttırdığı, hem Jurkat hem de K562 hücrelerinde kapsamlı morfolojik değişikliklere neden olduğu, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve seçici olarak doğrulandı. Çalışmamıza benzer şekilde Phl-MMC kompleksinin birbirinden izole edilen bileşiklere göre daha düşük genotoksisite değerlerine sahip olduğu sonucuna varıldı. Phl-MMC, MMC aktivitesini önemli ölçüde inhibe etti. Benzer bir çalışmada başka bir parametre gözlemlendi (Arumuggam ve ark., 2017). Phl varlığı, MMC ile tedavi

edilen hücrelerde genotoksik DNA hasarını ve hücre ölümünü aktif olarak önler (Barreca ve ark., 2017).

Çalışmamız Phl'nin anti-genotoksik özellikler barındırdığını göstermiştir. Phl'nin MMC'ye karşı genoprotektif özellikleri, antioksidan aktivitelerine ve lipidperoksidasyonu üzerindeki inhibitör etkisine bağlanabilir (Maatouk ve ark., 2018).

Bu araştırmanın genel amacı, *in vitro* hücre kültür ortamında Phl'nin genotoksik/anti-genotoksik potansiyelini MMC ile de kombinasyon halinde çalışarak belirlemektir. Elma kabuklarında bol miktarda bulunan bir flavonoid olan Floridzin ve MMC, tek başına veya kombinasyon halinde kullanılmıştır. Phl'nin MMC ile kombine edildiğinde, beklendiği gibi MMC'nin neden olduğu genotoksik etkileri hafifletmiştir. Bu çalışmanın geliştirilebilecek yönleri donör sayısının artırılması, dozlar arası farklılıkları daha net gözlemleyebilmek adına daha geniş bir Phl konsantrasyon aralığının seçilmesi ve anti-genotoksik etki deneylerinde hücrelerin Phl ile önceden muamele edileceği bir seçeneğin de eklenmesi biçiminde özetlenebilir. Son olarak bu çalışmada, Phl'nin uygulanan konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip olmadığı ve MMC gibi genotoksik bir ajanla birlikte kullanıldığında meydana gelecek genotoksik hasarı inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, gelecekte Phl ile ilgili yapılacak çalışmaların sayıca artması, Phl'nin anti-genotoksik potansiyelinin daha isabetli olarak ortaya konmasında fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmada, diğer fenolik bileşiklerle benzer şekilde vanilik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5, 25, 50, 100, 500 ve 1000 μ M) genotoksik ve anti-genotoksik etkileri Komet ve MN yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre hem Komet hem de MN testlerinde sağlıklı hücrelerde tek başına vanilik asit uygulamasının DNA hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Bununla birlikte Komet testinde vanilik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde MN testinde H₂O₂ ile birlikte vanilik asit uygulanan tüm gruplarda % MN frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma en düşük doz harici tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Sonuç olarak vanilik asit insan lenfositlerinde genotoksik bir etkiye neden

olmamakta, ancak H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarı ve MN oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir.

Bu çalışma ile benzer şekilde, Erdem ve diğerleri (2012), vanilik asidin in vitro insan periferik kan lenfosit kültüründe Mitomisin C (MMC) tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini incelemişler, 1 µg/ml konsantrasyonda vanilik asidin MMC tarafından indüklenen DNA hasarını ve MN içeren hücre frekansını istatistiksel olarak önemli oranda azalttığını ancak; komet testi ile yüksek konsantrasyondaki vanilik asidin (2 µg/ml) tek başına genotoksik etki oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Komet testinde benzer şekilde Phl'nin de tek başına özellikle 125 ve 500 µg/ml dozlarında komet alanı, komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk moment uzaklığı parametrelerinde negatif veya solvent kontrole kıyasla anlamlı derecede DNA hasarı yarattığı anlaşılmıştır. Bu farklılık istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmasa da bütün Phl dozlarında, solvent kontrole kıyasla daha yüksek GHİ değerleri olarak yansımıştır. Bununla beraber, gözlenen etkinin vanilik asitte olduğu gibi doza bağımlı olmadığı görülmüştür. Anti-genotoksik etkinin doza bağımlılığı incelendiğinde her iki yönde de örneklerin bulunduğu görülmektedir. Örneğin, usnik asit metil metan sülfonatın (MMS) yarattığı genotoksik hasarı doza bağımlı olmayan bir biçimde inhibe ettiği, diğer taraftan propolisin anti-genotoksik etkisinin sıkı bir biçimde doza bağımlı olduğu gösterilmiştir (Leandro ve ark., 2013; Bayram ve ark., 2015). Usnik asidin yükselen dozlarda genotoksik etki yarattığı bilgisine paralel olarak, bitkisel ekstraktların düşük konsantrasyonda antigenotoksik, yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermesi beklendiği söylenmektedir (Choi ve ark., 2003; Cao ve ark., 2007). Saf bir bitkisel bileşik olan Phl için de aynı durumun daha geniş konsantrasyon aralıklarında gözlenebileceği yorumlanmıştır.

Fenolik bileşiklerin etkileri altında yatan mekanizmaların tam ve doğru şekilde açıklanabilmesi için farklı deney modellerinin ve yöntemlerin seçilmesi de önemlidir. Yapılan bazı çalışmalarda etkisi incelenen fenolik bileşiklerin Komet yöntemiyle genotoksik etki göstermedikleri ancak MN testinde klastojenik etkili oldukları belirlenmişlerdir. Komet testi, primer DNA hasarının göstergesidir ve DNA katımlarının veya zincir kırıklarının mutasyon oluşumu sırasında genellikle ilk basamak

olarak meydana geldikleri, hasar sonrasında onarılabilecekleri bilinmektedir (Brendler-Schwaab ve diğeri, 2005). Diğeri yandan MN yapıları genellikle hücre bölünmesi sırasında kromozomal parçacıkların kaybı ile ortaya çıkan klastojenik bir etkinin sonucudur (Salamone ve diğeri, 1980). MN aynı zamanda tüm bir kromozom kaybı ile de ortaya çıkabilir ki bu anojenik etkiler comet testi ile tespit edilememektedir. Maistro ve diğeri (2011) araştırmalarında fenolik asitlerden kafeik, ferulik ve sinamik asidin HTC hücrelerinde (karaciğeri hücreleri) MN testinde klastojenik etki gösterdiğini bildirmeleri bu durumu desteklemektedir. Tez kapsamında uygulanan genotoksisite testlerinde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, Phl'nin anti-genotoksik etkisinin belirlenmesi noktasında CA testi ile MN ve Komet testleri arasında bir uyumsuzluk olduğu düşünülebilir. CA testinde MMC + Phl'nin bütün dozlarında negatif ve solvent kontrole kıyasla anlamlı derecede toplam CA artışı kaydedilmiştir. Ancak bu testte MMC'nin yarattığı toplam CA artışı solvent kontrole kıyasla anlamlı kabul edilmediğinden ötürü Phl'nin antigenotoksik potansiyelinin de sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesinin önüne geçmektedir. Bunun nedeni, farklı bireylerden elde edilen lenfositlerin, total aberasyon açısından MMC uygulamasına yüksek oranda farklı yanıtlar vermesi olabilir. Benzer derecede farklı yanıtlar solvent kontrol grubunda da mevcuttur. Toplam CA'nın cinsiyete bağı gösterildiği Çizelge 4.2'de ise söz konusu standart sapmanın MMC'de sadece kadınlarda, solvent kontrolde ise her iki cinsiyette gözleendiği görülmektedir. MMC değerindeki standart sapmanın sadece kadınlarda yüksek olması MN ve Komet testlerinde de karşılaşılan bir durumdur. Ancak bu testlerde MMC uygulaması sonucu gerçekleşen MN oranı, cinsiyete göre dağılımın sunulduğu Çizelge 4.4'te, Komet testi ile saptanan GHİ ise hem bütün donörleri dikkate alan hem de cinsiyete göre dağılımı gösteren çizelgelerde (Çizelge 4.6 ve 4.7) solvent kontrole kıyasla anlamlı derecede yükselmiştir. Dolayısıyla, Phl'nin anti-genotoksik potansiyelini değerlendirmede MN ve Komet test sonuçları MMC uygulamasında yüksek genotoksik hasar elde edildiği için dikkate alınacak testler olacaktır. Buna göre, bu testlerde MMC'nin yarattığı genotoksik hasar, MMC+Phl'nin farklı kombinasyonları tarafından istatistiksel olarak anlamlı seviyede tersine çevrilebildiği için Phl'nin antigenotoksik özelliklere sahip olduğu söylenebilir. Literatürde, genotoksisite testlerinde elde edilen sonuçlar arasında farklılıkların görüldüğü örnekler mevcuttur. Leandro vd. (2013), usnik asit ile yaptıkları çalışmada, kullandıkları yüksek dozların

Komet testinde genotoksik etki gösterdiğini, MN testinde ise herhangi genotoksik/anti-genotoksik etki göstermediğini bulmuşlardır. Üstelik, genotoksik etki gösteren usnik asit konsantrasyonu MMS ile kombinasyon halinde uygulandığında, bu maddenin yarattığı genotoksik hasarı hafifletici etki sergilemiştir (Leandro vd. 2013). Anti-genotoksik etkinin niceliği de kullanılan teste göre değişiklik gösterebilmektedir. *Limon otunun (Melissa officinalis)* genotoksik ve anti-genotoksik potansiyelinin değerlendirildiği bir makalede bu bitkinin ekstresi in vivo MN testinde MMC'nin indüklediği genotoksik hasarı tamamen engellemişken, komet testinde aynı deneysel koşullarda, MMC tarafından indüklenecek hasarı yaklaşık %35-45 oranında düşürebilmiştir (de Carvalho ve ark., 2011). Phl'nin anti-genotoksik etkisi bu bakımdan irdelendiğinde, 125 µg/ml dozunun Komet testinde MMC'nin yarattığı genotoksik etkiyi tamamen ortadan kaldırdığı, fakat aynı boyuttaki etki ile MN testinde kadınlarda karşılaştırırken erkeklerde rastlanmadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abilev, S. K., & Glaser, V. M. (2013). *Genetic toxicology: Findings and challenges*. Russian Journal of Genetics, 49(1), 70-80.
- Adams, L. S., Phung, S., Yee, N., Seeram, N. P., Li, L., & Chen, S. (2010). *Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. Cancer research, 70(9), 3594-3605.
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). *Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology*. Food chemistry, 149, 151-158.
- Andlauer, W., Kolb, J., & Fürst, P. (2004). *Phloridzin improves absorption of genistin in isolated rat small intestine*. Clinical Nutrition, 23(5), 989-995.
- Antika, L. D., Lee, E. J., Kim, Y. H., Kang, M. K., Park, S. H., Kim, D. Y., Oh, H., Choi, Y. J., & Kang, Y. H. (2017). *Dietary phlorizin enhances osteoblastogenic bone formation through enhancing β -catenin activity via GSK-3 β inhibition in a model of senile osteoporosis*. The Journal of nutritional biochemistry, 49, 42-52.
- Arumuggam, N. (2017). *Phloridzin Docosahexaenoate induces cytotoxic effects in human leukemic cells Phloridzin docosahexaenoate* (Msc. dissertation, University of Agri). DALHOUSE UNIVERSITY.
<https://sfxhosted.exlibrisgroup.com/dal?rft.atitle=PHLORIDZIN%20DOCOSAHEXAENOATE%20INDUCES%20CYTOTOXIC%20EFFECTS%20IN%20HUMAN%20LEUKEMIC%20CELLS&rft.aualast=Arumuggam&rft.aufirst=Niroshaathevi>. Arumuggam, N., Melong, N., Too, C. K., Berman, J. N., & Rupasinghe, H. V. (2017). *Phloridzin docosahexaenoate, a novel flavonoid derivative, suppresses growth and induces apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells*. American journal of cancer research, 7(12), 2452.
- Arumuggam, N., Melong, N., Too, C. K., Berman, J. N., & Rupasinghe, H. V. (2017). *Phloridzin docosahexaenoate, a novel flavonoid derivative, suppresses growth and induces apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells*. American journal of cancer research, 7(12), 2452.
- Avcı, A., Atlı, T., Ergüder, İ. B., Varlı, M., Devrim, E., Turgay, S. A. M., & Durak, I. (2007). *Effects of apple consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in elderly subjects*. Experimental aging research, 33(4), 429-437.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food chemistry, 99(1), 191-203.
- Baldisserotto, A., Malisardi, G., Scalambra, E., Andreotti, E., Romagnoli, C., Vicentini, C. B., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2012). *Synthesis, anti oxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications*. Molecules, 17(11), 13275-13289.
- Barreca, D., Currò, M., Bellocco, E., Ficarra, S., Laganà, G., Tellone, E., Giunta M. L., Visalli, G., Caccamo, D., Galtieri, A., & Ientile, R. (2017). *Neuroprotective effects of phloretin and its glycosylated derivative on rotenone-induced toxicity in human SH-SY5Y neuronal-like cells*. Bio Factors, 43(4), 549-557.
- Bannister, L. A., & Schimenti, J. C. (2004). *Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis*. Cytogenetic and genome research, 107(3-4), 191-200.

- Bauer, C. M., Ishak, M. B., Johnson, E. K., Beebe-Dimmer, J. L., & Cooney, K. A. (2012). *Prevalence and correlates of vitamin and supplement usage among men with a family history of prostate cancer*. *Integrative cancer therapies*, 11(2), 83-89.
- Bhattacharya, S. (2011). *Natural antimutagens: a review*. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(2), 116-126.
- Blicklé, J. F. (2014). *La découverte des propriétés glycosuriques de la phloridzine*. *Médecine des maladies Métaboliques*, 8(5), 544-549.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). *Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. *Nutrition and cancer*, 18(1), 1-29.
- Boccia, M. M., Kopf, S. R., & Baratti, C. M. (1999). *Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice*. *Neurobiology of learning and memory*, 71(1), 104-112.
- Borland, M. K., Trimmer, P. A., Rubinstein, J. D., Keeney, P. M., Mohanakumar, K. P., Liu, L., & Bennett, J. P. (2008). *Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells*. *Molecular neuro degeneration*, 3(1), 1-12.
- Boyapati, S. M., Shu, X. O., Ruan, Z. X., Dai, Q., Cai, Q., Gao, Y. T., & Zheng, W. (2005). *Soyfood intake and breast cancer survival: a followup of the Shanghai Breast Cancer Study*. *Breast cancer research and treatment*, 92(1), 11-17.
- Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). *Apple phytochemicals and their health benefits*. *Nutrition journal*, 3(1), 1-15.
- Bradford, B. J., & Allen, M. S. (2007). *Phlorizin induces lipolysis and alters meal patterns in both early-and late-lactation dairy cows*. *Journal of dairy science*, 90(4), 1810-1815.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brusick, D. (1988). *Evolution of testing strategies for genetic toxicity*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 205(1-4), 69-78.
- Budisan, L., Gulei, D., Zanoaga, O. M., Irimie, A. I., Chira, S., Braicu, C., Gherman, C.D., & Berindan-Neagoe, I. (2017). *Dietary intervention by phytochemicals and their role in modulating coding and non-coding genes in cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1178.
- Butler, M. S. (2004). *The role of natural product chemistry in drug discovery*. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
- Butterfield, D. A., & Keller, J. N. (2012). *Antioxidants and antioxidant treatment in disease*.
- Bzeouich, I. M., Mustapha, N., Maatouk, M., Ghedira, K., Ghoul, M., & Chekir-Ghedira, L. (2016). *Genotoxic and anti-genotoxic effects of esculin and its oligomer fractions against mitomycin C-induced DNA damages in mice*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 82, 48-52.
- Cai, Q., Li, B., Yu, F., Lu, W., Zhang, Z., Yin, M., & Gao, H. (2013). *Investigation of the protective effects of phlorizin on diabetic cardiomyopathy in db/db mice by quantitative proteomics*. *Journal of Diabetes Research*, 2013.
- Cao, J., Jiang, L. P., Liu, Y., Yang, G., Yao, X. F., Zhong, L. F., 2007. *Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells*. *Toxicol* 49, 1219-1222.

- Cardile, V., Lombardo, L., Spatafora, C., & Tringali, C. (2005). *Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues*. *Bioorganic Chemistry*, 33(1), 22-33.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs Jr, D. R., & Blomhoff, R. (2010). *The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide*. *Nutrition journal*, 9(1), 1-11.
- Choi, E. J., Chee, K. M., & Lee, B. H. (2003). *Anti-and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats*. *European Journal of Pharmacology*, 482(1-3), 281-285.
- Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). *Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice*. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1614.
- Chukwuebuka, E., & Chinenye, I. J. (2015). *Biological functions and anti-nutritional effects of phytochemicals in living system*. *J Pharm Biol Sci*, 10(2), 10-19.
- Costa, J. (2021, June 24). *Cancer*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/cancer-disease>.
- Costa, S., Carvalho, S., Costa, C., Coelho, P., Silva, S., Santos, L. S., Gaspar, J. F., Porto, B., Laffon, B., & Teixeira, J. P. (2015). *Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde*. *Mutagenesis*, 30(4), 463-473.
- Crespy, V., Aprikian, O., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigné, C., & Rémésy, C. (2001). *Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats*. *The Journal of nutrition*, 131(12), 3227-3230.
- David-Silva, A., Esteves, J. V., Morais, M. R. P., Freitas, H. S., Zorn, T. M., Correa-Giannella, M. L., & Machado, U. F. (2020). *Dual SGLT1/SGLT2 inhibitor phlorizin ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and hepatic glucose production in type 2 diabetic mice*. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 13, 739.
- De Flora, S., & Ferguson, L. R. (2005). *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 8-15.
- Deininger, M. W., & Druker, B. J. (2003). *Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib*. *Pharmacological reviews*, 55(3), 401-423.
- Deng, G. F., Xu, X. R., Li, S., Li, F., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2012). *Natural sources and bioactivities of resveratrol*. *Int J Modern Biol Med*, 1, 1-20.
- Deng, Q. P., Wang, M. J., Zeng, X., Chen, G. G., & Huang, R. Y. (2017). *Effects of glycyrrhizin in a mouse model of lung adenocarcinoma*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(4), 1383-1392.
- De Koninck, L. (1836). *Observations sur les propriétés febrifuges de la phloridzine*. *Bull Soc Med Gand*, 1, 75-110.
- de Oliveira, J. T., da Silva Barbosa, M. C., de Camargos, L. F., da Silva, I. V. G., de Pilla Varotti, F., da Silva, L. M., Moreira, L. M., Lyon, J. P., Vierira, V. J. da S., & dos Santos, F. V. (2017). *Digoxin reduces the mutagenic effects of Mitomycin C in human and rodent cell lines*. *Cytotechnology*, 69(4), 699-710.
- Doll, D. C., Weiss, R. B., & Issell, B. F. (1985). *Mitomycin: ten years after approval for marketing*. *Journal of Clinical Oncology*, 3(2), 276-286.

- Dong, H., Ning, Z., Yu, L., Li, L., Lin, L., & Huang, J. (2007). *Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of Lithocarpus polystachyus Rehd.* *Molecules*, 12(3), 552-562.
- Dorai, T., Gehani, N., & Katz, A. (2000). *Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. II. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor and depletes the protein.* *Molecular urology*, 4(1), 1-6.
- Dou, J., Wang, Z., Ma, L., Peng, B., Mao, K., Li, C., Su, M., Zhou, C., & Peng, G. (2018). *Baicalein and baicalin inhibit colon cancer using two distinct fashions of apoptosis and senescence.* *Oncotarget*, 9(28), 20089.
- Drugs.com. (2020, September 21). *Mitomycin Side Effects*. <https://www.drugs.com/sfx/mitomycin-side-effects.html>.
- Ebert, M. N., Beyer-Sehlmeyer, G., Liegibel, U. M., Kautenburger, T., Becker, T. W., & Pool-Zobel, B. L. (2001). *Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal.* *Nutrition and cancer*, 41(1-2), 156-164.
- Ebert, M. N., Klinder, A., Peters, W. H., Schäferhenrich, A., Sendt, W., Scheele, J., & Pool-Zobel, B. L. (2003). *Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate.* *Carcinogenesis*, 24(10), 1637-1644.
- Ehrenkranz, J. R., Lewis, N. G., Ronald Kahn, C., & Roth, J. (2005). *Phlorizin: a review.* *Diabetes/metabolism research and reviews*, 21(1), 31-38.
- Engström, W., Darbre, P., Eriksson, S., Gulliver, L., Hultman, T., Karamouzis, M. V., Klauning, J. E., Mehta, R., Moorwood, K., Sanderson, T., Sone, H., Vadgama, P., Wagemaker, G., Ward, A., Singh, N., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Colacci, A. M., Vaccari, M., Mondello, C., Scovassi, A. I., Raju, J., Hamid, R. A., Memeo, L., Forte, S., Roy, R., Woodrick, J., Salem, H. K., & Bisson, W. H. (2015). *The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signalling.* *Carcinogenesis*, 36(Suppl_1), S38-S60.
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). *Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy.* *Plant physiology*, 184(1), 39-52.
- Faivre, S., Djelloul, S., & Raymond, E. (2006, August). *New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors.* In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 4, pp. 407-420). WB Saunders.
- Fenech, M. (2000). *The in vitro micronucleus technique.* *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). *Measurement of micronuclei in lymphocytes.* *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.
- Ferguson, L. R., Philpott, M., & Karunasinghe, N. (2004). *Dietary cancer and prevention using antimutagens.* *Toxicology*, 198(1-3), 147-159.
- Ferrajoli, A., Faderl, S., Ravandi, F., & Estrov, Z. (2006). *The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies.* *Current cancer drug targets*, 6(8), 671-679.
- Flint, A. (1886). *A Treatise on the Principles and Practice of Medicine.* Lea Brothers & Company.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). *Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice.* *Frontiers in plant science*, 6, 799.

- Fromm, M., Bayha, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). *Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds*. Journal of agricultural and food chemistry, 60(5), 1232-1242.
- Furqan, M., Akinleye, A., Mukhi, N., Mittal, V., Chen, Y., & Liu, D. (2013). *STAT inhibitors for cancer therapy*. Journal of hematology & oncology, 6(1), 1-11.
- Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. (2014). *Optimization of reflux conditions for total flavonoid and total phenolic extraction and enhanced antioxidant capacity in pandan (Pandanus amaryllifolius Roxb.) using response surface methodology*. The Scientific World Journal, 2014.
- Giordano, S., Lee, J., Darley-Usmar, V. M., & Zhang, J. (2012). *Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death*.
- Gosch, C., Halbwirth, H., & Stich, K. (2010). *Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants*. Phytochemistry, 71(8-9), 838-843.
- Gross, C. J., & Kramer, J. A. (2003). *The role of investigative molecular toxicology in early stage drug development*. Expert opinion on drug safety, 2(2), 147-159.
- Hecht, S. S., Carmella, S. G., Kenney, P. M., Low, S. H., Arakawa, K., & Mimi, C. Y. (2004). *Effects of cruciferous vegetable consumption on urinary metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in Singapore Chinese*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 13(6), 997-1004.
- Hogstedt, C., Malmqvist, N., & Wadman, B. (1979). *Leukemia in workers exposed to ethylene oxide*. Jama, 241(11), 1132-1133.
- Hyson, D. A. (2011). *A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health*. Advances in nutrition, 2(5), 408-420.
- Illam, S. P., Hussain, A., Elizabeth, A., Narayanankutty, A., & Raghavamenon, A. C. (2019). *Natural combination of phenolic glycosides from fruits resists pro-oxidant insults to colon cells and enhances intrinsic antioxidant status in mice*. Toxicology reports, 6, 703-711.
- Imamura, K., Takeshima, T., Kashiwaya, Y., Nakaso, K., & Nakashima, K. (2006). *D-β-hydroxybutyrate protects dopaminergic SH-SY5Y cells in a rotenone model of Parkinson's disease*. Journal of neuroscience research, 84(6), 1376-1384.
- Iqbal, J., Abbasi, B. A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S. A., & Khalil, A. T. (2017). *Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(12), 1129-1150.
- Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ahmad, R., Batool, R., Mahmood, T., Ali, B., Khalil, A. T., Kanwal, S., Shah, S. A., Alam, S., M. M., Bashir, S., Badshah, H., & Munir, A. (2019). *Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 109, 1381-1393.
- Ishidate, M. Jr. And Sofuni, T. (1985). *The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture*. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- Iyer, V. N., & Szybalski, W. (1964). *Mitomycins and porfiromycin: chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA*. Science, 145(3627), 55-58.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 461(7267), 1071-1078.
- Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., SánchezGutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S. M., Sumaya-Martínez, M. T.,

- Morales-González, Á., Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., & Madrigal-Santillán, E. (2017). *Evidence of some natural products with antigentoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides*. *Nutrients*, 9(2), 102.
- Jagetia, G. C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., & Vidyasagar, M. S. (2001). *Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491(1-2), 9-16.
- Johnson, I. T. (2007). *Phytochemicals and cancer*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2), 207-215.
- Joseph, M. A., Moysich, K. B., Freudenheim, J. L., Shields, P. G., Bowman, E. D., Zhang, Y., Marshall, J. R., & Ambrosone, C. B. (2004). *Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk*. *Nutrition and cancer*, 50(2), 206-213.
- Jung, E., Lee, J., Huh, S., Lee, J., Kim, Y. S., Kim, G., & Park, D. (2009). *Phloridzin-induced melanogenesis is mediated by the cAMP signaling pathway*. *Food and chemical toxicology*, 47(10), 2436-2440.
- Kato, T., Hancock, R. L., Mohammadpour, H., McGregor, B., Manalo, P., Khaiboullina, S., Hall, M. R., Pardini, L., & Pardini, R. S. (2002). *Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice*. *Cancer letters*, 187(1-2), 169-177.
- Kaur, R., Shah, T. K., Kaur, S., & Rani, S. (2018). *A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment*. *J Pharm Innov*, 7(1), 353-359.
- Khalifa, M. M., Bakr, A. G., & Osman, A. T. (2017). *Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 529-535.
- Kim, H. Y., Kim, O. H., & Sung, M. K. (2003). *Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers*. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(3), 217-223.
- Kirkland, D. J., Henderson, L., Marzin, D., Müller, L., Parry, J. M., Speit, G., Tweats, D. J., & Williams, G. M. (2005). *Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 588(2), 88-105.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., & Aromaa, A. (1997). *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms*. *American journal of epidemiology*, 146(3), 223-230.
- Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., & Oike, H. (2012). *Phloridzin reduces blood glucose levels and alters hepatic gene expression in normal BALB/c mice*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2547-2553.
- Koren, E., Kohen, R., & Ginsburg, I. (2010). *Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells*. *Experimental Biology and Medicine*, 235(6), 689-699.
- Kumar, S., Sinha, K., Sharma, R., Purohit, R., & Padwad, Y. (2019). *Phloretin and phloridzin improve insulin sensitivity and enhance glucose uptake by subverting PPAR γ /Cdk5 interaction in differentiated adipocytes*. *Experimental cell research*, 383(1), 111480.

- Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S. K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2019). *Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques*. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 1-21.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J., & Talpaz, M. (2003). *Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics*. *Annals of internal medicine*, 138(10), 819-830.
- Lansky, E. P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Froom, P., Yu, W., Harris, N. M., Neeman, I., & Campbell, M. J. (2005). *Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions*. *Investigational new drugs*, 23(1), 11-20.
- Lee, C. C., Dudonné, S., Dubé, P., Desjardins, Y., Kim, J. H., Kim, J. S., Kim, J. E., Park, J. H. Y., Lee, K. W., & Lee, C. Y. (2017). *Comprehensive phenolic composition analysis and evaluation of Yak-Kong soybean (*Glycine max*) for the prevention of atherosclerosis*. *Food chemistry*, 234, 486-493.
- Lee, J. H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., & Kong, A. N. T. (2013). *Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression*. *Pharmacology & therapeutics*, 137(2), 153-171.
- Lee, W. L., Huang, J. Y., & Shyur, L. F. (2013). *Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, P., & Chapple, C. (2000). *Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism*. *The Plant Cell*, 12(8), 1295-1306.
- Lemma, M. T., Ahmed, A. M., Elhady, M. T., Ngo, H. T., Vu, T. L. H., Sang, T. K., Campos-Alberto, E., Sayed, A., Mizukami, S., Na-Bangchang, K., Huy, N. T., Hirayama, K., & Karbwang, J. (2017). *Medicinal plants for in vitro antiplasmodial activities: A systematic review of literature*. *Parasitology international*, 66(6), 713-720.
- Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W. G. (2009). *The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells*. *Methods*, 48(1), 46-53.
- Lu, L., Zhao, Z., Liu, L., Gong, W., & Dong, J. (2018). *Combination of baicalein and docetaxel additively inhibits the growth of non-small cell lung cancer in vivo*. *Traditional Medicine and Modern Medicine*, 1(03), 213-218.
- Maatouk, M., Mustapha, N., Mokdad-Bzeouich, I., Chaaban, H., Ioannou, I., Ghedira, K., Ghoul, M., & Chekir-Ghedira, L. (2018). *Heated naringin mitigate the genotoxicity effect of Mitomycin C in BALB/c mice through enhancing the antioxidant status*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1417-1423.
- Maffei, F., Tarozzi, A., Carbone, F., Marchesi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Forti, G. C., & Hrelia, P. (2007). *Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes*. *British Journal of Nutrition*, 97(5), 921-927.
- Majer, B. J., Laky, B., Knasmüller, S., & Kassie, F. (2001). *Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2-3), 147-172.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2005). *Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14813-14818.

- Masumoto, S., Akimoto, Y., Oike, H., & Kobori, M. (2009). *Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice*. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4651-4656.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., & Kirsch-Volders, M. (2006). *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring*. *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., & Collins, A. (1993). *The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.
- Meddle, J. A., & Carrano, A. V. (1977). *The DNA content of micronuclei in mouse bone marrow by gamma-radiation—evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments*. *Mutagenesis*, 44, 63-69.
- Mei, X., Zhang, X., Wang, Z., Gao, Z., Liu, G., Hu, H., Zou, L., & Li, X. (2016). *Insulin sensitivity-enhancing activity of phlorizin is associated with lipopolysaccharide decrease and gut microbiota changes in obese and type 2 diabetes (db/db) mice*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(40), 7502-7511.
- Merck E. *Verzeichnissammtlicherpreparateunddrogen*. Merck Archives, E Merck (ed). Darmstadt, Germany; 1885; 67.
- Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y. F., Kobayashi, H., Igarashi-Soga, M., Shimoi, K., & Hayashi, M. (1998). *Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 418(2-3), 131-140.
- Mohamed, S. A. K. S., Upreti, S., Rajendra, S. V., & Dang, R. (2017). *Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods*. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 133-138.
- Morse, M. A., LaGreca, S. D., Amin, S. G., & Chung, F. L. (1990). *Effects of indole-3-carbinol on lung tumorigenesis and DNA methylation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and on the metabolism and disposition of NNK in A/J mice*. *Cancer research*, 50(9), 2613-2617.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Muceniece, R., Namniece, J., Nakurte, I., Jekabsons, K., Riekstina, U., & Jansone, B. (2016). *Pharmacological research on natural substances in Latvia: Focus on lunasin, betulin, polyphenol and phlorizin*. *Pharmacological research*, 113, 760-770.
- Naghibi, F., Esmaeili, S., Abdullah, N. R., Nateghpour, M., Taghvai, M., Kamkar, S., & Mosaddegh, M. (2013). *In vitro and in vivo antimalarial evaluations of myrtle extract, a plant traditionally used for treatment of parasitic disorders*. *BioMed research international*, 2013.
- Nair, S. V., & Rupasinghe, H. V. (2014). *Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression*. *PLoS One*, 9(9), e107149.
- Natarajan, A. T. (1993). *Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations*. *Environmental health perspectives*, 101(suppl 3), 225-229.

National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 5746, Mitomycin*. Retrieved August 12, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mitomycin>.

Nelson, J. A., & Falk, R. E. (1993). *The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth*. *Anticancer research*, 13(6A), 2287-2292.

Nelson, J. A., & Falk, R. E. (1993). *Phloridzin and phloretin inhibition of 2-deoxy-d-glucose uptake by tumor cells in vitro and in vivo*. *Anticancer research*, 13(6A), 2293-2299.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). *The influence of natural products upon drug discovery*. *Natural product reports*, 17(3), 215-234.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). *Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014*. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

Niederberger, K. E., Tennant, D. R., & Bellion, P. (2020). *Dietary intake of phloridzin from natural occurrence in foods*. *British Journal of Nutrition*, 123(8), 942-950.

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., Martines-Lopez, W., Folle, G. A., & Drets, M. E. (2002). *Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 17-36.

Ogbonna, J., Kenechukwu, F., Attama, A., & Chime, S. (2012). *Different approaches to formulation of herbal extracts/phytopharmaceuticals/bioactive phytoconstituents—a review*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 16(1), 1-8.

Oleszek, M., Pecio, Ł., Kozachok, S., Lachowska-Filipiuk, Ż., Oszust, K., & Frąc, M. (2019). *Phytochemicals of apple pomace as prospect bio-fungicide agents against mycotoxigenic fungal species—in vitro experiments*. *Toxins*, 11(6), 361.

Ornston, L. N., & Yeh, W. K. (1979). *Origins of metabolic diversity: evolutionary divergence by sequence repetition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(8), 3996-4000.

Osorio, H., Bautista, R., Rios, A., Franco, M., Arellano, A., Vargas-Robles, H., Romo, E., & Escalante, B. (2010). *Effect of phlorizin on SGLT2 expression in the kidney of diabetic rats*. *Journal of nephrology*, 23(5), 541-546.

Ostling, G., & Johanson, K. J. (1984). *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.

Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., & Greenamyre, J. T. (2005). *Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42026-42035.

Park, E. J., & Pezzuto, J. M. (2015). *The pharmacology of resveratrol in animals and humans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular basis of disease*, 1852(6), 1071-1113.

Petric, R. C., Braicu, C., Raduly, L., Zanoaga, O., Dragos, N., Monroig, P., Dumitrascu, D., & Berindan-Neagoe, I. (2015). *Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers*. *OncoTargets and therapy*, 8, 2053.

Phlorizin. (2017). *ChemicalBook*. Retrieved from https://www.chemicalbook.com/ProductChemical Properties CB0331801_EN.htm.

Pierce, J. P., Natarajan, L., Caan, B. J., Parker, B. A., Greenberg, E. R., Flatt, S. W., Rock, C. L., Kealey, S., Al-Delaimy, W. K., Bardwell, W. A., Carlson, R. W., Edmond, J. A., Faerber, S., Gold, E. B., Hajek, R. A., Hollenbach, K., Jones, L. A., Karanja, N.,

- Madlensky, L., Marshall, J., Newman, V. A., Ritenbaugh, C., Thomson, C. A., Wasserman, L., & Stefanick, M. L. (2007). *Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial*. *Jama*, 298(3), 289-298.
- Puel, C., Quintin, A., Mathey, J., Obled, C., Davicco, M. J., Lebecque, P., Kati-Coulibaly, S., Horcajada, M. N., & Coxam, V. (2005). *Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions*. *Calcified tissue international*, 77(5), 311-318.
- Qin, X., Xing, Y. F., Zhou, Z., & Yao, Y. (2015). *Dihydrochalcone compounds isolated from crabapple leaves showed anticancer effects on human cancer cell lines*. *Molecules*, 20(12), 21193-21203.
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (Eds.). (2013). *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes* (pp. 1541-2662). Berlin: Springer.
- Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y., & Zhou, C. H. (2017). *The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications*. *Journal of translational medicine*, 15(1), 1-13.
- Reuland, D. J., Khademi, S., Castle, C. J., Irwin, D. C., McCord, J. M., Miller, B. F., & Hamilton, K. L. (2013). *Upregulation of phase II enzymes through phytochemical activation of Nrf2 protects cardiomyocytes against oxidant stress*. *Free Radical Biology and Medicine*, 56, 102-111.
- Rezk, B. M., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (2002). *The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids*. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(1), 9-13.
- Rocha, A., Wang, L., Penichet, M., & Martins-Green, M. (2012). *Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer*. *Breast cancer research and treatment*, 136(3), 647-658.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., López-Oliva, E., Agis-Torres, A., Gómez-Juaristi, M., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L., & Martín, M. Á. (2011). *Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis*. *Molecular nutrition & food research*, 55(12), 1895-1899.
- R Vasanthi, H., ShriShriMal, N., & K Das, D. (2012). *Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease*. *Current medicinal chemistry*, 19(14), 2242-2251.
- Salem, M. S. Z. (2014). *Basic concepts of medical genetics, formal genetics*, Part 1. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15(1), 99-101.
- Sandhir, R., & Mehrotra, A. (2013). *Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: implications in Huntington's disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(3), 421-430.
- Sasaki, M., Okamura, M., Ideo, A., Shimada, J., Suzuki, F., Ishihara, M., Kikuchi, H., Kanda, Y., Kunii, S., & Sakagami, H. (2006). *Re-evaluation of tumor-specific cytotoxicity of mitomycin C, bleomycin and peplomycin*. *Anticancer research*, 26(5A), 3373-3380.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schmid, W. (1976). *The micronucleus test for cytogenetic analysis*. In *Chemical mutagens* (pp. 31-53). Springer, Boston, MA.

- Shah, S. U. (2012). *Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 1(2), 43-54.
- Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, et al. (2009). *Phase I trial of daily oral polyphenon E (green tea extract) in patients with asymptomatic stage 0-II chronic lymphatic leukaemia*. Journal of Clinical Oncology, 27(23): 3808–3814.
- Shehzadi, K., Rubab, Q., Asad, L., Ishfaq, M., Shafique, B., Ali, M. M., Ranjha, N., Mahmood, S., Mueen-Ud-Din, G., Javaid, T., Sabtain, B., & Farooq, R. (2020). *A critical review on presence of polyphenols in commercial varieties of apple peel, their extraction and Health benefits*. Open Access J. Biog. Sci. Res, 6, 18.
- Shin, S. K., Cho, S. J., Jung, U. J., Ryu, R., & Choi, M. S. (2016). *Phlorizin supplementation attenuates obesity, inflammation, and hyperglycemia in diet-induced obese mice fed a high-fat diet*. Nutrients, 8(2), 92.
- Siddiqui, R. A., Harvey, K. A., Xu, Z., Bammerlin, E. M., Walker, C., & Altenburg, J. D. (2011). *Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects*. Biofactors, 37(6), 399-412.
- Sinawe H, Casadesus D. (2020, September 3). *Mitomycin*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562249/>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Experimental cell research, 175(1), 184-191.
- Singh, N. P., & Stephens, R. E. (1997). *Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electro stretching*. Mutation Research/DNA Repair, 383(2), 167-175.
- Singleton, V. L., & Kratzer, F. H. (1969). *Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17(3), 497-512.
- 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.
- Smith, M. W. (2021, January 11). *What Is Targeted Therapy for Cancer?* WebMD. <https://www.webmd.com/cancer/guide/targeted-therapy-cancer>.
- Somasundaram, S., Edmund, N. A., Moore, D. T., Small, G. W., Shi, Y. Y., & Orłowski, R. Z. (2002). *Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer*. Cancer research, 62(13), 3868-3875.
- Song, F., Qureshi, A. A., & Han, J. (2012). *Increased caffeine intake is associated with reduced risk of basal cell carcinoma of the skin*. Cancer research, 72(13), 3282-3289.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T. (2005). *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions*. Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis, 579(1-2), 200-213.
- Sood, S., Choudhary, S., & Wang, H. C. R. (2013). *Induction of human breast cell carcinogenesis by triclocarban and intervention by curcumin*. Biochemical and biophysical research communications, 438(4), 600-606.
- Sowa, A., Zgórką, G., Szykuła, A., Franiczek, R., Żbikowska, B., Gamian, A., & Sroka, Z. (2016). *Analysis of polyphenolic compounds in extracts from leaves of some Malus domestica cultivars: Antiradical and antimicrobial analysis of these extracts*. BioMed research international, 2016.

- Srivastava, S. K., Arora, S., Averett, C., Singh, S., & Singh, A. P. (2015). *Modulation of microRNAs by phytochemicals in cancer: underlying mechanisms and translational significance*. BioMed research international, 2015.
- Sumner, J. (2000). *The natural history of medicinal plants*. Timber press.
- Sun, C. L., Yuan, J. M., Koh, W. P., Lee, H. P., & Yu, M. C. (2007). *Green tea and black tea consumption in relation to colorectal cancer risk: the Singapore Chinese Health Study*. Carcinogenesis, 28(10), 2143-2148.
- Sung, J., & Lee, J. (2010). *Antioxidant and antiproliferative activities of grape seeds from different cultivars*. Food Science and Biotechnology, 19(2), 321-326.
- Stiles PG, Lusk G. (1903). *On the action of phlorizin*. Am J Physiol, 10: 61– 79.
- Swierenga, S. H. H., Heddle, J. A., Sigal, E. A., Gilman, J. P. W., Brillinger, R. L., Douglas, G. R., & Nestmann, E. R. (1991). *Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 246(2), 301-322.
- Swift, L. H., & Golsteyn, R. M. (2014). *Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells*. International journal of molecular sciences, 15(3), 3403-3431.
- ŞEKEROĞLU, Z. A., ŞEKEROĞLU, V., & KOLÖREN, Z. (2011). *The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology*. Journal of Applied Biological Sciences, 5(1), 49-54.
- Takeiri, A., Tanaka, K., Harada, A., Matsuzaki, K., Yano, M., Motoyama, S., Katoh, C., & Mishima, M. (2017). *Giemsa-stained pseudo-micronuclei in rat skin treated with vitamin D 3 analog, pefcalcitol*. Genes and Environment, 39(1), 1-7.
- Takeuchi, J., Kyo, T., Naito, K., Sao, H., Takahashi, M., Miyawaki, S., Kuriyama, K., Ohtake, S., Yagasaki, F., Murakami, H., Asou, N., Ino, T., Okamoto, T., Usui, N., Nishimura, M., Shinagawa, K., Fukushima, T., Taguchi, H., Morii, T., Mizuta, S., Akiyama, H., Nakamura, Y., Ohshima, T., & Ohno, R. (2002). *Induction therapy by frequent administration of doxorubicin with four other drugs, followed by intensive consolidation and maintenance therapy for adult acute lymphoblastic leukemia: the JALSG-ALL93 study*. Leukemia, 16(7), 1259-1266.
- Tan, A. C., Konczak, I., Sze, D. M. Y., & Ramzan, I. (2011). *Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals*. Nutrition and cancer, 63(4), 495-505.
- Thilakarathna, S. H., Rupasinghe, H. V., & Needs, P. W. (2013). *Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation*. Food chemistry, 138(1), 463-470.
- Thomas, R., Butler, E., Macchi, F., & Williams, M. (2015). *Phytochemicals in cancer prevention and management*. British Journal of Medical Practitioners, 8(2), 1-8.
- Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P., & Danson, S. J. (2015). *The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours*. British journal of cancer, 113(3), 365-371..
- Tian, L., Cao, J., Zhao, T., Liu, Y., Khan, A., & Cheng, G. (2021). *The Bioavailability, Extraction, Biosynthesis and Distribution of Natural Dihydrochalcone: Phloridzin*. International Journal of Molecular Sciences, 22(2), 962.

- Tian, Y., Gao, L., Guo, Y., & Xu, Y. (2017). *Short-term phlorizin treatment attenuates adipose tissue inflammation without alerting obesity in high-fat diet fed mice*. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12407.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ruy, J.-C., & Sasaki, Y. F. (2000). *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Tuteja, N., & Tuteja, R. (2001). *Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect*. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 36(3), 261-290.
- Tweats, D. J., Scott, A. D., Westmoreland, C., & Carmichael, P. L. (2007). *Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity in vitro—challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive*. *Mutagenesis*, 22(1), 5-13.
- Uzzo, R. G., Brown, J. G., Horwitz, E. M., Hanlon, A., Mazzoni, S., Konski, A., Greenberg, R. E., Pollack, A., Kolenko, V., & Watkins-Bruner, D. (2004). *Prevalence and patterns of self-initiated nutritional supplementation in men at high risk of prostate cancer*. *BJU international*, 93(7), 955-960.
- Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2013). *JAK/STAT signaling in hematological malignancies*. *Oncogene* 32, 2601–2613.
- Vasantha Rupasinghe, H. P., & Yasmin, A. (2010). *Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin*. *Molecules*, 15(1), 251-257.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., & Pool-Zobel, B. L. (2006). *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics*. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 45(3), 164-174.
- Verweij, J., & Pinedo, H. M. (1990). *Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations*. *Anti-cancer drugs*, 1(1), 5-13.
- Vickery, M. L., & Vickery, B. (1981). *Secondary plant metabolism*. Macmillan Press.
- Wang, G. E., Li, Y. F., Wu, Y. P., Tsoi, B., Zhang, S. J., Cao, L. F., Kurihara, H., & He, R. R. (2014). *Phloridzin improves lipoprotein lipase activity in stress-loaded mice via AMPK phosphorylation*. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(7), 874-880.
- Wang, H., Cheng, J., Wang, H., Wang, M., Zhao, J., & Wu, Z. (2019). *Protective effect of apple phlorizin on hydrogen peroxide-induced cell damage in HepG2 cells*. *Journal of food Biochemistry*, 43(12), e13052.
- Wang, H., Sun, Z., Liu, D., Li, X., Rehman, R. U., Wang, H., & Wu, Z. (2019). *Apple phlorizin attenuates oxidative stress in Drosophila melanogaster*. *Journal of food biochemistry*, 43(3), e12744.
- Wang, L., Li, X., & Wang, Z. (2016). *Whole body radioprotective effect of phenolic extracts from the fruits of Malus baccata (Linn.) Borkh.* *Food & function*, 7(2), 975-981.
- Wang, X., Zhang, S., Liu, Y., Spichtig, D., Kapoor, S., Koepsell, H., Mohebbi, N., Segerer, S., Serra, A. L., Rodriguez, D., Devuyt, O., Mei, C., & Wüthrich, R. P. (2013). *Targeting of sodium–glucose cotransporters with phlorizin inhibits polycystic kidney disease progression in Han: SPRD rats*. *Kidney international*, 84(5), 962-968.

- Ward, A. C., Touw, I., & Yoshimura, A. (2000). *The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(1), 19-29.
- Williams, M., Thomas, R., Butler, E., & Macchi, F. (2015). *Phytochemicals in cancer prevention and management?*. *British Journal of Medical Practitioners*, 8(2).
- Wolff, S., & Perry, P. (1974). *Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography*. *Chromosoma*, 48(4), 341-353.
- Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., & Wu, J. T. (2004). *Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics*. *Clinica chimica acta*, 339(1-2), 1-9.
- Wu, S., Li, S., Xu, X. R., Deng, G. F., Li, F., Zhou, J., & Li, H. B. (2012). *Sources and bioactivities of astaxanthin*. *Int. J. Mod. Biol. Med*, 1, 96-107.
- Xiang, L., Sun, K., Lu, J., Weng, Y., Taoka, A., Sakagami, Y., & Qi, J. (2011). *Anti-aging effects of phloridzin, an apple polyphenol, on yeast via the SOD and Sir2 genes*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(5), 854-858.
- Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X. (2002). *Inhibition of carcinogenesis by tea*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), 25-54.
- Yan, X. B., Xie, T., Wang, S. D., Wang, Z., Li, H. Y., & Ye, Z. M. (2018). *Apigenin inhibits proliferation of human chondrosarcoma cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis induced by ROS generation-an in vitro and in vivo study*. *International Journal Clinical Experimental Medicine*, 11(3), 1615-1631.
- Yamaguchi, K., Kato, M., Suzuki, M., Asanuma, K., Aso, Y., Ikeda, S., & Ishigai, M. (2011). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effect of an sodium-glucose cotransporter inhibitor, phlorizin, on renal glucose transport in rats*. *Drug metabolism and disposition*, 39(10), 1801-1807.
- Zhai, Y., Dang, Y., Gao, W., Zhang, Y., Xu, P., Gu, J., & Ye, X. (2015). *P38 and JNK signal pathways are involved in the regulation of phlorizin against UVB-induced skin damage*. *Experimental Dermatology*, 24(4), 275-279.
- Zhang, H. N., Yu, C. X., Chen, W. W., & Young, C. Y. (2007). *Curcumin down regulates gene NKX3. 1 in prostate cancer cell lines (LNcaP)*(2007). *Acta Pharmacologica*.
- Zhang, S., Jia, Z., Yan, Z., & Yang, J. (2017). *Consumption of fruits and vegetables and risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis of observational studies*. *Oncotarget*, 8(17), 27892.
- Zhang, Y., Huang, L., Shi, H., Chen, H., Tao, J., Shen, R., & Wang, T. (2018). *Ursolic acid enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer by inhibition of drug resistance*. *Cancer science*, 109(1), 94-102.
- Zhang, Y. J., Gan, R. Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A. N., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). *Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases*. *Molecules*, 20(12), 21138-21156.
- Zhang, Z., Liu, F., He, C., Yu, Y., & Wang, M. (2017). *Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of phloridzin from malus micromalus makino with ethanol/ammonia sulfate system*. *Journal of food science*, 82(12), 2944-2953.
- Zhao, Y., Liu, C., Lai, X., Hou, S., Zeng, X., & Li, X. (2017). *Immunomodulatory activities of phlorizin metabolites in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 cells*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 49-53.

Zielinska, D., Laparra-Llopis, J. M., Zielinski, H., Szawara-Nowak, D., & Giménez-Bastida, J. A. (2019). *Role of apple phytochemicals, phloretin and phloridzin, in modulating processes related to intestinal inflammation*. *Nutrients*, 11(5), 1173.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sindi Vekshari
Doğum Yeri ve Tarihi : Shkoder, 09.05.1995
Yabancı Dil : Arnavutça, Türkçe, İngilizce ve İtalyanca.

Eğitim Durumu
Lise : Oso Kuka Lisesi (2013)
Lisans : LuigjGurakuqi Üniversitesi (2016)
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi (2021)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : English School, Shkoder/Arnavutluk (7 ay), 2016
WUS-Albania, Shkoder/Arnavutluk (1 ay), 2017

İletişim (e-posta) : Sindiidnis01@gmail.com