

**ALKİLLEYİCİ AJANLAR TARAFINDAN  
UYARILAN GENOTOKSİSİTE  
ÜZERİNE CURCUMİN'İN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Nilay İŞİTEZ  
DANIŞMAN  
Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2014

Bu tez çalışması 12.FENBİL.04 numaralı proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ALKİLLEYİCİ AJANLAR TARAFINDAN UYARILAN**  
**GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE CURCUMİN'İN ETKİSİ**

**Nilay İŞİTEZ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Haziran, 2014**

## TEZ ONAY SAYFASI

Nilay İŞİTEZ tarafından hazırlanan ‘Alkilleyici Ajanlar Tarafından Uyarılan Genotoksisite Üzerine Curcumin’in Etkisi’adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 06/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** :Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

**Başkan** : Prof. Dr. Muhsin KONUK  
Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

**Üye** : Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR  
AKÜ Fen Edebiyat Fakültesi

**Üye** : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
AKÜ Fen Edebiyat Fakültesi

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Recep LİMAN  
Uşak Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun  
...../...../..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....  
Enstitü Müdürü  
(Prof. Dr. Yılmaz YALÇIN)



**ÖZET**  
Doktora Tezi

ALKİLLEYİCİ AJANLAR TARAFINDAN UYARILAN GENOTOKSİSİTE  
ÜZERİNE CURCUMİN'İN ETKİSİ

Nilay İŞİTEZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

DNA hasarı organizmaların yaşamı boyunca maruz kaldığı önemli bir genotoksik stres türüdür. Doğrudan etkili alkilleyici ajanlardan olan metil metansülfonat (MMS), DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA'da hasar oluştururken, dolaylı yoldan etkili alkilleyici ajanlardan olan siklofosfamid (SP) ise hücresel proteinlerin fonksiyonlarını değiştirerek DNA hasarına sebep olur. Bu çalışmada, deneysel olarak MMS ve SP uygulanan farelerde DNA hasarı, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite (oksidatif stres indeksi) ile genotoksisite belirteci mikronukleus indeksi ve hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd45 ve Gadd153'ün ifadelerindeki değişiklikler ve bunlara curcumin'in etkileri araştırıldı. Önce curcumin, sonra MMS ve SP'in uygulandığı gruplarda, curcumin'in DNA hasar derecesini mononükleer lökositlerde azalttığı, kemik iliğinde oluşan mikronukleus sayısını azalttığı, plazmada oksidatif stresi azalttığı ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan Gadd45 ve Gadd153'ün mRNA ekspresyon düzeylerinin uyarılmasını sağlayarak koruyucu özellik gösterdiği bulundu. Sonuç olarak, fenolik bir bileşik olan curcumin'in, hasar oluştuktan sonra değil de, hasar oluşmadan önce koruyucu özellik göstererek antioksidan ve antijenotoksik özelliğe sahip olduğu bulundu.

**2014, xii, 86 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Alkilleyici Ajan, Genotoksisite, Comet Assay, Curcumin, Gen Ekspresyonu

**ABSTRACT**  
PhD Thesis

EFFECT OF CURCUMIN ON THE GENOTOXICITY INDUCED BY ALKYLATING  
AGENTS

Nilay İŞİTEZ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

**Supervisor:** Asst. Prof. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

DNA damage due to genotoxic stress is an important type of stress which organisms are exposed during their life. The direct-acting alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS), is covalently linked to DNA and cause DNA damage, creating an indirect effect of the alkylating agent cyclophosphamide (CP) cause to DNA damage by changing the function of cellular proteins. In this study, the effects of curcumin on MMS and SP treated mice DNA damage, total antioxidant capacity, total oxidant capacity (oxidative stress index) and genotoxicity markers such as micronucleus index, cell growth arrest and induced DNA damage, which is Gadd45 and Gadd153 genes expression levels were investigated. Curcumin reduce DNA damage, the number of micronucleus and oxidative stress occurred by both MMS and SP induction. Curcumin's protective effect on DNA damage was provided by inducing Gadd45 and Gadd153 mRNA expression levels. We could state that curcumin, a phenolic compound show protective effects before the damage. In brief, curcumin has both antioxidant and antigenotoxic effects.

**2014, xii, 86 pages**

**Keywords:** Alkylating Agents, Genotoxicity, Comet Assay, Curcumin, Gene Expression

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin DEMİREL'e, Öğrt. Grv. Serkan ŞEN'e, Arş Grv. Eyüp Eren GÜLTEPE'ye, Biyolog Şöhret YÜKSEK'e, Biyolog Emre ÖZGÜL'e ve Biyolog Halil TURHAN'a her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve 12.FEN.BİL.04 No'lu "Alkilleyici Ajanlar Tarafından Uyarılan Genotoksisite Üzerine Curcumin'in Etkisi" adlı tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Nilay İŞİTEZ

AFYONKARAHİSAR, 2014

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. DNA Hasarı.....	3
2.1.1. DNA Hasarına Neden Olan Endojen Etkenler.....	3
2.1.2. DNA Hasarına Neden Olan Ekzojen Etkenler.....	4
2.2. Hücre Büyümesini Durduran ve İndüklenmiş DNA Hasar Genleri (Gad Genleri).....	10
2.2.1. Gadd153 Geni.....	10
2.2.2. Gadd45 Geni.....	13
2.3. DNA Tamiri ve Mekanizmaları.....	18
2.3.1. Direkt Onarım Mekanizması ya da Hasarın Geri Döndürülmesi.....	18
2.3.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Mekanizması.....	19
2.3.3. Rekombinasyonel Onarım Mekanizması.....	21
2.3.4. SOS Onarım Mekanizması.....	21
2.3.5. DNA Çift Zincir Kırığı Onarım Mekanizması.....	21
2.4. Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Kullanılan Antioksidanlar... 23	
2.4.1. Curcumin'in Moleküler Yapısı.....	26
2.4.2. Curcumin'in Metabolizması.....	27
2.4.3. Curcumin'in Biyolojik Etkileri.....	28
2.4.3.1. Curcumin'in Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkisi.....	29
2.4.3.2. Curcumin'in Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi.....	30
2.4.3.3. Curcumin'in Anjiogenezisi Düzenleyici Etkisi.....	30
2.4.3.4. Curcumin'in Antikanser Etkisi.....	31
2.4.3.5. Curcumin'in Antimikrobiyal Etkisi.....	31
2.5. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler.....	32



2.5.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Comet Assay).....	32
2.5.2. Mikronukleus (MN) Yöntemi.....	33
2.5.3. Revers Transkriptaz Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR-QRT PCR).....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
3.1.3. Hayvan Materyali.....	41
3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	41
3.1.5. Doku Örnekleri ve Kemik İliğinin Alınması.....	43
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Tek Hücre Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	43
3.2.2. Mononükleer Lökositlerde DNA Hasarının Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği İle <i>In vitro</i> Tayini.....	45
3.2.3. Mikronukleus Yönteminde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması..	46
3.2.4. Kemik İliği Örneklerinde <i>In vivo</i> Mikronükleus Tespiti.....	47
3.2.5. RNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	48
3.2.5.1. RNA İzolasyonu.....	48
3.2.5.2. RNA'ların Kalite Kontrolü.....	48
3.2.5.3. cDNA Sentezi.....	49
3.2.5.4. Real Time QRT- PCR.....	50
3.2.6. Plazmada TAK ile TOK'un Hesaplanması.....	52
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53
4.1. Curcumin'in 24. ve 48. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri.....	53
4.1.1. Curcumin'in 24. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri.....	53
4.1.2. Curcumin'in 48. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri.....	54
4.2. Curcumin'in Fare Kemik iliği Hücrelerinde MMS ve SP ile Uyarılan Genotoksisite Üzerine Etkileri.....	56
4.3. Curcumin MMS ve SP ile Uyarılan Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	58
4.4. Gadd Genlerine Ait Bulgular.....	59

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	63
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	85

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

dk	Dakika
dL	Desilitre
g	Gram
$\mu$ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
mA	Miliamper
M	Molar
V	Volt
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
%	Yüzde
<	Küçüktür

---

### Kısaltmalar

---

8-OH-Gua	8-hidroksi guanin
AP	Apirimidinik / Apürinik bölge
AU	Arbitrary Unit
BER	Baz eksizyon onarımı
bZIP	Bazik lösün fermuar
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Etil
CH <sub>3</sub>	Metil
COMET	Tek hücre jel elektroforezi
COOH	Karboksil
Ct	Eşik değerinin aşıldığı döngü sayısı
DMS	Dimetil sülfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMS	Etil metan sülfonat
ER	Endoplazmik retikulum
FAM	Fosfamid mustard

---

---

Gadd	Hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar genleri
G-C	Guanin-Sitozin
HCl	Hidroklorik asit
HR	Homolog rekombinasyon
IARC	Uluslar arası kanser araştırma enstitüsü
IR	İyonize radyasyon
JNK	c-Jun-N-terminal kinaz
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum fosfat
KCl	Potasyum Klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum hidrojen fosfat
LMPA	Düşük erime noktalı agar
LOOH	Lipid hidroperoksit
MAPK	Mitojeni aktive eden protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MEF	Fare embriyo fibroblastları
MER	Yanlış eşleşme eksizyon onarımı
mG	O6-Metilguanin
MMS	Metil metan sülfonat
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
MNU	N-metil-N-nitrozür
N7-meG	N7-metilguanin
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NER	Nükleotid eksizyon onarımı
NH <sub>2</sub>	Amino
NHEJ	Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması
NMPA	Normal erime noktalı agar
NO <sub>2</sub>	Azot dioksit
O <sub>3</sub>	Ozon
OH	Hidroksil
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCNA	Çoğalmış hücre nükleer antijeni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri

---

---

Rpm	Dakikadaki dönüş hızı
SCE	Kardeş kromatid değişimi
SH	Standart hata
SP	Siklofosfamid
SSB:	Tek ipliğe bağlanma proteini
T-A	Timin-Adenin
TAK	Total antioksidan kapasite
Tm	Erime sıcaklığı
TOK	Total oksidan kapasite
TUNEL	Terminal deoksिनükleotidil transferaz aracılığıyla dUTP son uç etiketlemesi
UV	Ultraviyole

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1 MMS'in moleküler yapısı.....	6
Şekil 2.2 SP'in moleküler yapısı.....	6
Şekil 2.3 SP'in metabolizması .....	7
Şekil 2.4 Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı yoldan etkisi.....	9
Şekil 2.5 Gadd153 proteininin yapısı.....	11
Şekil 2.6 Gadd45 geninin p53 ile düzenlenmesi.....	14
Şekil 2.7 Hücre döngüsünün G <sub>2</sub> -M kontrol noktasında p53-Gadd45 yolağı.....	16
Şekil 2.8 DNA hasarı sonucu oluşan süreç.....	18
Şekil 2.9 <i>Curcuma longa</i> bitkisi.....	26
Şekil 2.10 Curcumin'in kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.11 Curcuminoidlerin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.12 Curcumin'in biyolojik özellikleri.....	28
Şekil 2.13 Fare kemik iliğinde <i>in vivo</i> MN protokolü.....	35
Şekil 2.14 RT-PCR akış şeması.....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 3.1</b> Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları..	50
<b>Çizelge 4.1</b> Curcumin'in 24. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına etkileri.....	53
<b>Çizelge 4.2</b> Curcumin'in 48. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına etkileri.....	55
<b>Çizelge 4.3</b> MMS ve SP ile uyarılan fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen total MN PCE değerleri ile PCE/NCE oranı.....	57
<b>Çizelge 4.4</b> Curcumin'in MMS ve SP ile uyarılan oksidatif stres üzerine etkisi.....	58
<b>Çizelge 4.5</b> Moleküler analizi yapılan genlerin Real-time quantitative PCR (RT-PCR) Ct sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.6</b> Moleküler analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyonlarına göre uyarılma (+) veya baskılanma (-) durumları.....	60

## RESİMLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Resim 4.1</b> Curcumin'in 24. ve 48. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına ait Comet görüntüleri.....	55
<b>Resim 4.2</b> MMS ve SP ile uyarılan fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen PCE, NCE ve MN PCE görüntüleri.....	57



## 1. GİRİŞ

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Fakat DNA hasarı veya genotoksik stres canlıların yaşamı boyunca maruz kaldığı kaçınılmaz ve önemli bir stres türüdür. DNA hasarına neden olan etkenler hem endojen hem de ekzojen kaynaklı olabilir.

DNA hasarı oluşturan ekzojen etkenlerin başında alkilleyici ajanlar meydana gelmektedir. Bu alkilleyici ajanlar bazıları alkilleyerek, oksitleyerek, bazılar arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına sebep olarak DNA hasarına sebep olurlar. Alkilleyici ajanlardan olan MMS, serbest oksijen radikalleri gibi DNA'ya kovalent olarak bağlanarak doğrudan DNA'da hasar oluştururken, antineoplastik ajan olan SP ise hücrel proteinlerin fonksiyonlarını değiştirerek dolaylı yoldan DNA hasarına sebep olur. Eğer bu ajanların etkisiyle meydana gelen DNA hasarı hücrede tamir edilemezse mutasyona veya genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık ise hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (Junk *et al.* 2000).

Son zamanlarda bu tür ajanların genotoksik ve sitotoksik etkilerini en az düzeye indirecek bitkisel ilaç veya doğal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Bu tür ajanlara bağlı olumsuz etkilerin azaltılması hatta ortadan kaldırılmasına yönelik kullanılacak bu tür tedavi yöntemleri, deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarla daha da önem kazanmaktadır. Bitkisel kökenli ilaçların kullanılmasındaki amaç, immün sistemin korunmasına veya düzenlenmesine bağlı olarak, hasar oluşturan ajanların toksik etkilerinin azaltılması veya ortadan kaldırılmasıdır (Kumar and Kutter 2005).

Yapılan çalışmalarda bitkisel kökenli ilaçların veya gıdaların tüketilmesine bağlı olarak, kanser veya kalp hastalıkları gibi önemli hastalıkların ilerleme riskinin azaldığı ve bu durumda bitkisel kaynaklı olan fitokimyasallar aracılığı ile olduğu öne sürülmektedir (Zheng and Wang 2001, Tosetti *et al.* 2009). Tek başlarına besin özelliği taşımayan ve biyolojik olarak aktif olan bitkisel ürünlere fitokimyasal adı verilir (Dündar 2001).

Fitokimyasal moleküller birden fazla hedef molekül ile etkileşime girerek farklı sinyal yollarında, genlerin ifadesinde veya çeşitli metabolik yolların düzenlenmesinde etkilidirler (Raspor *et al.* 2005, Manach *et al.* 2009). Fitokimyasallar; terpenoidler, alkaloidler, karbonhidratlar, yağlar ve fenolik bileşikler olmak üzere birkaç gruba ayrılabilir. Bu bileşiklerden bazılarının serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu bileşiklerin serbest radikalleri süpürücü özelliği antioksidan aktivite göstermeleri ile ilişkilidir. Antioksidanlar, zincir reaksiyonlarının oksitleyici yayılımı ve inhibisyonunun başlamasıyla lipidlerin veya diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktirerek veya engelleyerek genotoksisiteyi veya hücre yaşlanmasını engelleyebilir (Zheng *et al.* 2001).

Son zamanlarda yapılmış olan epidemiyolojik, klinik ve hayvan çalışmaları ile curcumin'in; antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileştirici, antimutajenik, antikarsinojenik, antimetazatik, nöro koruyucu, angiogenezi düzenleyici gibi birçok özelliği olan ve dolaşımında toksik özellik göstermeyen doğal bir madde olduğu belirtilmiştir (Limtrakul *et al.* 1997, Priyadarsini 1997, Pandya *et al.* 2000, Hatcher *et al.* 2008). Bu çalışmada, deneysel olarak alkileyici ajanlara maruz bırakılmış farelerde DNA hasarı, total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) gibi bazı biyokimyasal parametrelerdeki değişimler ile genotoksisite belirteci mikronukleus indeksi ve hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerin ifadelerindeki değişiklikler ile bunlara curcumin'in etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. DNA Hasarı

DNA hasarı organizmaların yaşamı boyunca maruz kaldığı önemli bir genotoksik stres türüdür (Fornace *et al* 1989, Junk *et al.* 2000). Bir canlıya ait tüm genetik bilgileri taşıyan DNA molekülü dolayısıyla genom, çeşitli faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. DNA hasarına neden olan etkenler ekzojen veya endojen olabilir. Genetik materyalin tümünde ekzojen veya endojen etkenlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişikliklere “DNA Hasarı” adı verilir (Kulaksız ve Sancar 1997). Endojen faktörlere örnek olarak, DNA replikasyonu sırasında oluşan hasarlar, deaminasyon, depürinasyon, depirimidinasyon gibi baz hasarları ve serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasar verilebilir. Ekzojen faktörler ise, ultraviyole (UV) ışınları, iyonize radyasyon gibi fiziksel ya da aflatoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları ve alkilleyici ajanlar gibi kimyasal olabilir (Onur *et al.* 2009).

#### 2.1.1. DNA Hasarına Neden Olan Endojen Etkenler

Endojen etkenlerin oluşturduğu hasar tiplerinden biri DNA replikasyonu sırasında meydana gelmektedir. DNA replikasyonunda yanlış nükleotidin eklenmesiyle oluşan hata, replikasyonun bir sonraki döngüsünde hatalı nükleotidin kopyalanmasına ve dolayısıyla DNA hasarına sebep olur. DNA polimeraz enzimindeki hatalar spontan mutasyon oluşumunu etkiler. DNA polimerazın doğruluk oranını etkileyen en önemli faktör hata okuma 3'-5' ekzonükleaz aktivitesidir. Bu aktivite, DNA polimeraz tarafından yanlış eklenen bazların çıkarılmasına dolayısıyla replikasyon esnasında hasar oluşumunu engellemeye yarar.

Hücrelerde hasar oluşturan diğer bir olay baz degradasyonudur. Sitozinin deaminasyon sonucu urasile dönüşümü, hücrelerde gerçekleşme oranı yüksek bir olaydır. Deaminasyon, normalde DNA’da bulunmaması gereken Urasil bazının fark edilmesiyle onarılır (Bütüner ve Kantarcı 2006). Bu deaminasyon olayı günde yaklaşık 100 baz çiftini etkiler.

DNA'dan her gün yaklaşık 5000 pürin bazı (adenin ve guanin) glikozil bağları hidrolize olduğu için kaybolmaktadır. Bu olaya da depürinasyon denir (Onur *et al.* 2009).

Ayrıca serbest oksijen radikallerinin DNA'daki bazıları hasara uğratması sonucunda da endojen DNA hasarı meydana gelebilir. Bunlar, hücrede normal oksidatif metabolizma sonucu veya radyasyon gibi fiziksel etkenler nedeniyle oluşur. Bu şekilde 100'den fazla DNA hasarı belirlenmiştir. Örneğin; oksidasyon ürünü 8-hidroksi guanin (8-OH-Gua) adeninle baz çifti oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu için mutajenik bir üründür ve replikasyon sırasında adeninle baz çifti oluşturur (Balajee and Bohr 2000, Verjat *et al.* 2000). Bu şekilde endojen etkenlerle oluşan hasar tamir mekanizmaları tarafından onarılmaz ise somatik mutasyonlar ortaya çıkar (Duguid *et al.* 1995).

### **2.1.2. DNA Hasarına Neden Olan Ekzojen (Çevresel) Etkenler**

Fiziksel etkenlerden olan UV ışınları, DNA ve diğer moleküllerle reaksiyona girerek pirimidin dimerleri (T-T, T-C) oluştururlar. Oluşan bu dimerler, replikasyonu ve transkripsiyonu bloke ederler. İyonize radyasyon olan gamma ve X ışınları ise, biyolojik moleküllerle reaksiyona girdiklerinde reaktif iyonlar oluştururlar. Bunun sonucunda baz hasar ve kayıpları, tek veya çift zincir kırıkları (rekombinasyon uyarılır, baz delesyonu, kromozom kayıpları görülür), DNA'nın kendisiyle ya da proteinlerle çapraz bağlar oluşur (Bütüner ve Kantarcı 2006). Özellikle pürin/pirimidin bazlarının kaybı sonucu AP (Apürinik/Apirimidinik) bölgelerinin oluşması en sık görülen DNA hasarlarından biridir.

Bilinen en etkili karaciğer karsinojenleri arasında olan Aflotoksinler doğal bir metabolizma ürünü olup, DNA hasarına yol açabilen kimyasal bir ajandır. Aflotoksin B1, fungus kaynaklı aflotoksinler arasında en kuvvetli hepatokarsinojendir. Aflotoksin B1, karaciğer mikrozomal enzim ekstraktında bulunan P-450'nin, karışık fonksiyonlu oksijenaz enzimleriyle oksidasyonu sonucu, aflotoksin B1-8,9-epoxide denilen ara ürüne dönüşür (Çulcu 2007).

Benzopren kanserojen olmadığı halde hücre içinde okside olduğu zaman kanserojenik hale gelir. Ardından, DNA'da guanin gruplarına bağlanarak G-C bağlantısının arasına girerek heliks yapının bozulmasına neden olur. Kemoterapi ilaçlarından olan sisplatin ve alkilleyici ajanlar, DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır (Arlett *et al.* 2006).

Ekzojen etkenlerden olan alkilleyici ajanlar, DNA ve RNA gibi organik makromoleküllere, proteinlerin amino, karboksil, sülfüdril, fosfat grupları yerine alkil gruplarını ( $\text{CH}_2$ , metil ya da etil) transfer ederek hücre fonksiyonlarının bozulmasına yol açan ajanlardır (Klug ve Cummings 2003). Guaninin N 7 pozisyonu en sık alkilenen bölgedir ve alkilenme sonucunda mRNA yanlış kodlanır ve DNA sarmalında kırıklar oluşur. Alkilleyici ajanlara örnek olarak, metil metansülfonat (MMS), etil metansülfonat (EMS), dimetil sülfat (DMS), N-metil-N-nitrözür (MNU), N-metil-N'-nitro-N-nitrözguanidin (MNNG) ve SP verilebilir (Wyatt ve Pittman 2006). Bu ajanlar, deneylerde mutajen olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar (Gollapudi *et al.* 1998).

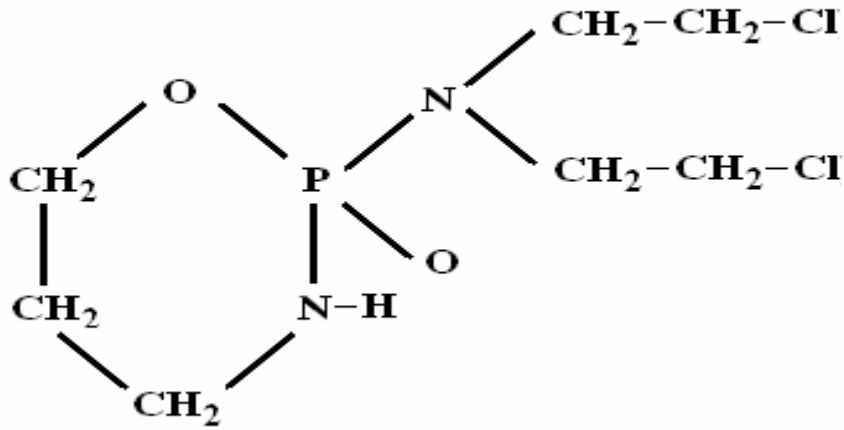
Alkilleyici ajanlardan olan MMS; DNA ve aminoasitlerin özellikle nitrojen atomlarının nükleofilik bölgelerini metilleme özelliğinde olan, zayıf mutajenik ve karsinojenik etki gösteren bir moleküldür (Horvathova *et al.* 1998, Franke *et al.* 2005). MMS'in genotoksik etkisi, baz modifikasyonlarına bağlıdır. MMS'in bazlarla reaksiyona girmesi sonucunda bazların N-glikozidik bağları zayıflar ve DNA zincirinde depürinasyon/depirimidinasyona yol açarak abazik bölgelerin (AP bölgeleri) oluşumuna neden olur (Loeb *et al.* 1986). Oluşan bu AP bölgelerinin uzaklaştırılması AP endonükleaz enzimleri tarafından olur (Horvathova *et al.* 1998). Ayrıca MMS'in zayıf bir oksidatif stres indükleyicisi olarak davrandığı belirtilmiştir (Horvathova *et al.* 1998).

MMS, yapısında reaktif grup olarak sülfür içeren, doğrudan etkili monofonksiyonel bir ajandır ve tek reaktif grubuna sahip olduğu için DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yapar. MMS çözücü olarak kullanılmaktadır, ayrıca polimerizasyon, alkilasyon ve esterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak da rol oynamaktadır (Şekil 2.1).(Vrzoc and Petras 1997).



Şekil 2.1 MMS'in moleküler yapısı

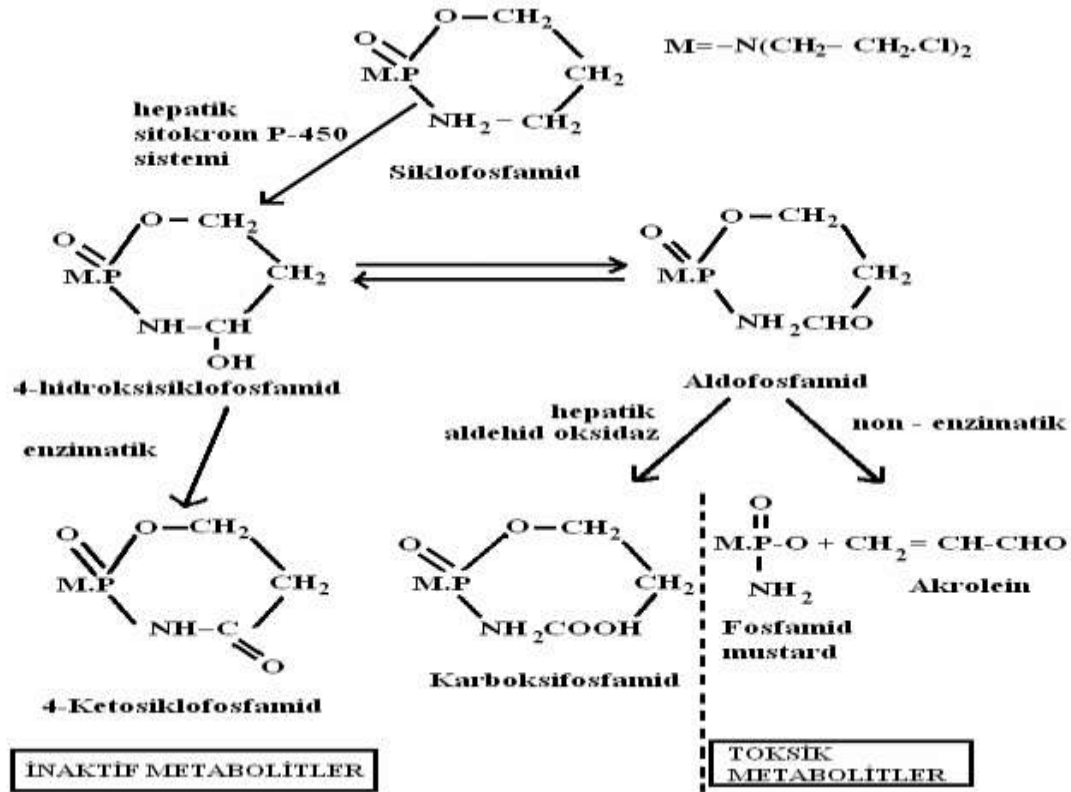
Kanser tedavisinde çok kullanılan ve bağışıklık sistemini baskılayıcı bir ilaç olan SP [2-bis (kloroetil) amino tetrahidro- 2H -1,2,3 oksazofosforin 2-oksit] ise bifonksiyonel alkilleyici ajandır. 2 tane reaktif grup taşır ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girer (Şekil 2.2) (Ayhancı 1997, Franke *et al.* 2005).



Şekil 2.2 SP'in moleküler yapısı

SP'nin genotoksik etkisi aktif olan metabolitleri aracılığı ile olur, çünkü normalde SP inaktif formdadır. SP'nin kanserostatik aktivitesi, fosforamid mustard (FAM) oluşumuna neden olan hepatik enzimlerden karma fonksiyonlu oksidaz enziminin metabolizmasına bağlıdır. SP'nin bağışıklık baskılayıcı özelliği de metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. SP, P-450 monooksijenaz sisteminin etkisiyle 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Daha sonra bu metabolit enzimatik olmayan bir mekanizmayla aldofosfamide dönüşür.

Son olarak aktif metabolitleri olan fosforamid mustard ve akroleine ayrılır. Aktif metabolitlerden olan FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, dolayısıyla SP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca akrolein de organik makromoleküllerin sülfidril gruplarıyla kolayca reaksiyona girerek bağışıklık sisteminde rol oynamaktadır (Şekil 2.3) (Ayhancı 1997, Hengstler *et al.* 1997).



Şekil 2.3 SP'in metabolizması

SP'nin toksik etki göstermesinde etkili olan metaboliti akrolein'dir. Akrolein, dokularda antioksidan savunma mekanizmasına müdahale ederek yüksek oranda serbest radikal oluşumuna sebep olur ve oluşan serbest radikaller, enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle etkileşime girerek onların fonksiyonlarının bozulmasına yol açar (Senthilkumar *et al.* 2006). Oluşan ara ürünlerinin veya son metabolitlerinin; kanser seçiciliği, sistemik toksisite, mutajenite, genotoksisite ve kanserojenite gibi farklı etkilere sahip olabileceği öne sürülmektedir (Ayhancı 1997). Ayrıca SP'nin apoptozisi tetiklediği ve lenfoid ve tümör hücrelerinde sitotoksisiteyi indükleyerek teratojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Matalon *et al.* 2004).

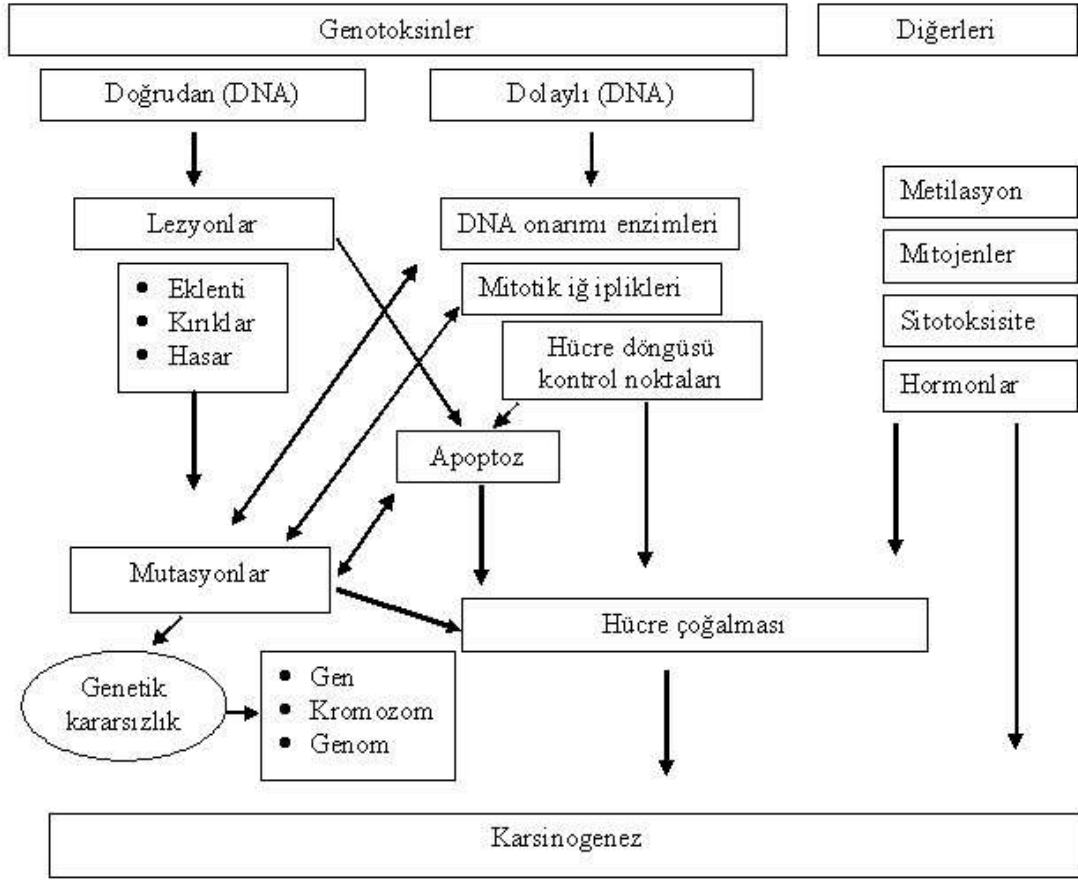
Elektrofilik özellikteki bu kimyasal ajanların, DNA gibi hücrel makromoleküllerin nükleofilik bölgelerine bağlanması sonucu oluşturdukları etkiye “Genotoksisite” adı verilir (Yırtıcı 2007). Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 1992 yılında yayınlanan raporda genotoksisite kavramının, DNA’daki doğrudan ve dolaylı etkileri kapsadığı ifade edilmiştir (Yırtıcı 2007). Bunlar;

- Moleküler düzeyde mutasyonlarının (gen, kromozomal, rekombinasyonel) induksiyonu,
- Mutageniz ile ilişkili dolaylı olaylar veya kardeş kromatid değişimi (SCE) ve
- Mutasyonlara neden olabilecek DNA hasarları (DNA’ya eklentiler)’dir.

Kısaca genotoksisite; çekirdek, kromozom veya DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite veya anöplöidi gibi hasarları içeren genel bir kavramdır (Şekeroğlu 2011). DNA’nın yapısında meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon adı verilir. Hücre ve/veya organizma popülasyonlarında mutasyona neden olan fiziksel veya kimyasal ajanlara mutajen veya genotoksin adı verilir (Yırtıcı 2007). DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşerek mutasyona neden olan genotoksinlerin DNA’da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açmasına genotoksik etki denir (Mortelmans and Rupa 2004, Zeiger 2004).

Eğer mutasyonlar vücut hücrelerinde ortaya çıkarsa organizmanın doğrudan kendisi etkilenir. Eşey hücrelerinde ortaya çıkan mutasyonlar ise zigota aktararak sonraki nesillere geçebilir. Genotoksisite çeşitli mekanizmalarla tamir edilebilir özelliktedir ve bu yüzden her zaman mutasyon olarak tanımlanmaz (Yırtıcı 2007). Genotoksisiteye sebep olan ajanların veya mutajenlerin genotoksik etkisi, hücrel hedeflerine bağlıdır. Bazı kimyasal maddelerin mutajenik etkisini göstermesi için metabolize edilmesi gerekebilir. Mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yoldan gösterebilirler (Şekil 2.4) (Kirsh *et al.* 2003, Mateuca *et al.* 2006, Kulaksız ve Sancar 2007).





**Şekil 2.4** Genotoksinlerin DNA üzerindeki doğrudan ve dolaylı yoldan etkisi

Endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen DNA hasarına karşı hücre, farklı metabolik yollar ile cevap verir (Kulaksız ve Sancar 2007). Bunlar;

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı)
2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (Transkripsiyonel cevap),
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması (apoptoz).

Ayrıca DNA'ya zarar veren ajanlara (iyonize radyasyon, UV radyasyon, alkilleyici ajanlar gibi) maruz kalma sonucunda, apoptozisin indüklenmesi, DNA tamir oranının artması veya hücre döngüsünün durdurulması gibi biyolojik olaylarla ilişkili genlerin ifadeleri (ekspresyonları) değişerek, genotoksik strese ya da DNA hasarına yanıt oluşur (Kastan *et al.* 1992, Islaih *et al.* 2004). Hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreler çeşitli genlerin uyarılmasıyla, çeşitli ajanların oluşturduğu strese karşılık verirler (Jung *et al.* 2000).

Bu şekilde uyarılan gen ailesinden biri de Gadd (Hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar genleri) gen ailesidir.

## **2.2. Hücre Büyümesini Durduran ve İndüklenmiş DNA Hasar Genleri (Gadd Genleri)**

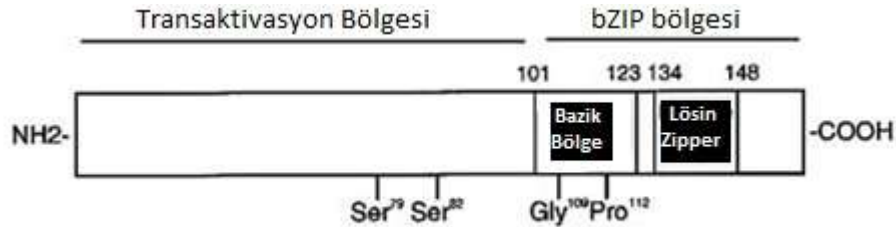
Hücre büyümesinin durdurulması ve indüklenmiş DNA hasarı ile ilişkili olan 5 tane gen tanımlanmıştır. Bu genler Gadd153, Gadd45, Gadd34, Gadd33 ve Gadd7'dir (Fornace *et al.* 1988, Fornace *et al.* 1989).

### **2.2.1. Gadd153 Geni**

Gadd153 geni ilk olarak UV ışığa ve alkilleyici ajanlardan olan MMS'a maruz bırakılmış hamster hücrelerinden izole edilmiştir (Fornace *et al.* 1989). Daha sonraları Gadd153 geninin, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşturduğu stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi durumlarda da indüklendiği belirtilmiştir (Zinszner *et al.* 1998). Bu gen aynı zamanda CCAAT enhanser'a bağlanma proteini olan CEBP transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan CEBP Homoloji Proteini (CHOP)'ni kodlayan bir gendir (Lovat *et al.* 2003).

Gadd153 (CHOP) geni, insanlarda 169 aminoasiti, kemirgenlerde ise 168 aminoasiti kodlayan 29 kDa'luk küçük nüklear bir proteindir. Başlangıçta bu proteinin, CEBP'ler için dominant negatif inhibitör olarak rolü olduğu bilinmekteydi. Fakat daha sonraları hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasının düzenlenmesinde, immün sistem ve inflamatuvar sistemde de rolü olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda ER stresine yanıtta, apoptozis için önemli bir aracı molekül olduğu belirtilmiştir (Zinszner *et al.* 1998, McCullough *et al.* 2001).

Bu protein, amino (NH<sub>2</sub>) ucunda transkripsiyonel aktivasyon bölgesi ve karboksil (COOH) ucunda bazik aminoasitlerden zengin DNA'ya bağlanma bölgesi ve lösin fermuar dimerizasyon motifini içeren bazik lösin fermuar (bZIP) bölgesi olmak üzere iki tane fonksiyonel bölge içerir. Ayrıca, p38 MAP kinaz proteinleri için substrat olarak görev yapan, birbirine bitişik 2 tane serin rezidüsü (79 ve 82) ile bazik bölgede DNA'ya bağlanma aktivitesini bozan glisin ve prolin rezidüleri içerir (şekil 2.5) (Oyadomari and Mori 2004).



Şekil 2.5. Gadd153 proteininin yapısı

Bu gen çok düşük seviyelerde eksprese edilen bir gen olmasına rağmen, MMS gibi genotoksik ajanlara, kalsiyum iyonofora, lipopolisakkaritlere maruz kalma ve besin yokluğu (glukoz veya aminoasit yokluğu) gibi stres koşullarında önemli ölçüde eksprese edilmektedir (Fornace *et al.* 1989, Carlson *et al.* 1993). Normal şartlar altında (stres faktörü olmadığı zaman) bu protein sitozolde bulunmaktadır. Fakat stres faktörü Gadd153 proteininin indüklenmesine ve çekirdekte birikmesine yol açar (Ron and Habener 1992). Sonraki çalışmalarda, DNA'ya zarar veren nükleozid analoglarının veya UV ışığının tek başına bu geni indükleyemediği belirtilmiştir (Wang *et al.* 1996).

Glukoz yokluğunun, ER'da N-bağlı protein glikozilasyonu aracılığıyla ER stresine yol açtığı bilinmektedir. Bu genin diğer indükleyicileri; tunikamisin, tapsigargin ve ditiotreitol 'dur. Bunlardan tunikamisin protein glikozilasyonunu inhibe etmektedir. Tapsigargin, ER kalsiyum stoklarının boşalmasıyla ER stresine sebep olurken, ditiotreitol ise disülfid bağı oluşumunu engelleyerek ER'un fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Alkilleyici ajanlardan olan MMS ise, DNA'ya zarar vermesinden ziyade, ER proteinlerindeki sistein rezidülerini alkilleyerek, ER proteinlerinin katlanmasını etkilemektedir. Bu sonuçlardan dolayı, Gadd153 geninin indüksiyonu, DNA hasarına göre ER stresine daha duyarlıdır.

Gadd153 proteininin farelere mikroenjeksiyonu sonucunda, hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S fazında durmasına veya apoptozise yol açtığı görülmüştür ve bundan dolayı bu proteinin ER stresi ile indüklenmiş apoptoziste önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Ron and Habener 1992, Matsumoto *et al.* 1996, Oyadomari and Mori 2004). Bu gen ER stresi indüklenen apoptozise aracılık eden ilk gen olarak belirlenmiştir. Apoptozis doku homeostazının sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Artan apoptozis, hücre kaybı vasıtasıyla diyabet ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olurken, azalmış apoptozis ise kanser ve otoimmün hastalıklara sebep olmaktadır. Diyabet, kanser, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların gelişimi, Gadd153 geninin indüksiyonu ile alakalı olduğu için, bu geni hedef alan tedaviler, bu hastalıkların önlenmesinde faydalı olabilir. Örneğin, bu genin RNA interferans yöntemiyle susturulması sonucunda, oligodeoksinükleotidleri veya ilaç inhibitörleri tuzağa düşürülerek, diyabet, beyin iskemisi gibi hastalıklarda tedavi edici ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca Gadd153 geninin aşırı ekspresyonu sayesinde kanser tedavisinde de kullanılabilir (Oyadomari and Mori 2004).

### 2.2.2. Gadd45 Geni

Gadd45 gen ailesinin üyeleri, hücre döngüsünü durduran sinyaller ya da DNA'ya zarar veren ajanlarla uyarılan veya indüklenen genlerdir. Gadd45 gen ailesi kendi arasında, Gadd45 (Gadd45a/Gadd45 $\alpha$ ), Gadd45b (Myd118/Gadd45 $\beta$ ) ve Gadd45g (CR6/OIG37/Gadd45 $\gamma$ ) olmak üzere 3'e ayrılır (Hildesheim and Fornace 2002). Bu 3 Gadd45 geninin % 57 homoloji (benzerlik) gösterdiği ve stres faktörleri ile uyarıldığı bilinmektedir (Hilsheim ve Fornace 2002). Gadd45 ailesi üyelerinin geçici olarak memeli hücrelerine transfeksiyonu sonucunda, büyümeyi baskılayıcı özellik gösterdikleri bulunmuş fakat biyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (Zhan *et al.* 1994, Zhan *et al.* 1998, Nakayama *et al.* 1999, Takekawa and Saito 1998).

Bütün Gadd45 ailesi proteinlerinin; PCNA (çoğalmış hücre nükleer antijeni), p21 (WAF1/CIP1) ve MTK1 (mitojeni aktive eden protein kinaz 1) proteinleri ile birlikte DNA tamiri, hücre büyümesinin durdurulması ve JNK (c-Jun N- terminal kinaz) enzimi aracılığı ile apoptozisi indüklediği belirtilmiştir (Kearsey *et al.* 1995, Vairapandi *et al.* 1996, Takekawa and Saito 1998, Nakayama *et al.* 1999).

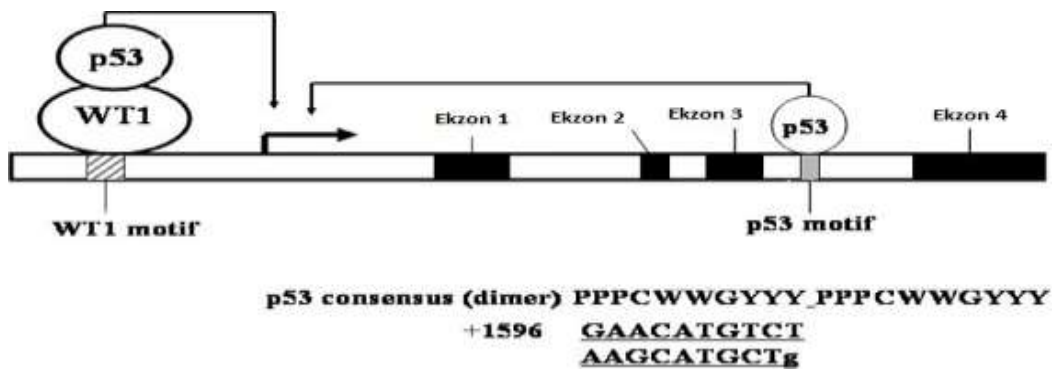
Gadd45 gen ailesi üyelerinden olan Gadd45 (Gadd45a/Gadd45 $\alpha$ ), moleküler ağırlığı 18.000 Dalton olan küçük asidik globüler bir proteindir (Liebermann and Hoffman 2007). Bu gen ilk defa UV radyasyona maruz bırakılmış Çin hamsterların yumurtalık hücrelerinden izole edilmiştir. Daha sonraları ise, besin azlığı, büyüme faktörlerinin gerilemesi, iyonize radyasyon, kemoterapötik ilaçlar, hipoksi, hidrojen peroksit, melfalan, nitrojen mustard ve MMS gibi büyümeyi durduran ve DNA'ya zarar veren ajanlarla da indüklendiği bulunmuştur (Fornace *et al.* 1988, Fornace 1992). DNA hasarının ardından Gadd45 geninin indüksiyonu hızlı, geçici ve doza bağımlıdır. UV ve MMS gibi DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmış memeli hücrelerinde, Gadd45 geninin indüklendiği bulunmuştur. Bu hücreler, insan fibroblast, lenfoblast ve kanser hücre hatları ile fare hücre hatlarıdır (Fornace *et al.* 1989, Fornace *et al.* 1992).

Bu gen, normal dokularda geniş ölçüde eksprese edilen 165 aminoasitlik bir proteini kodlar. Gadd45 geninin ekspresyonu hücre döngüsü esnasında düzenlenmektedir. Bu proteininin seviyesi hücre döngüsünün G1 fazında oldukça yüksek iken, S fazına geçince azalır (Kearsey *et al.* 1995, Carrier *et al.* 1996).

Gadd45 proteininin, birçok sitoplazmik ve nükleer faktörlerle ilişkili olduğu bulunmuş ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA tamiri ve genomik kararlılık, apoptozis, immün sistem ve MAPK (mitojeni aktive eden protein kinaz) sinyalizasyon yolağı gibi farklı hücrel fonksiyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (Smith *et al.* 1994, Kearsey *et al.* 1995, Takekawa and Saito 1998, Hollander *et al.* 1999, Kovalsky *et al.* 2001, Salvador *et al.* 2002). Bu hücrel fonksiyonların biri veya birkaçındaki kusurun kansere yol açtığı bilinmektedir.

DNA hasarına hücrel yanıtın kontrolünde, Gadd45 proteininin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. DNA hasarının ardından Gadd45 geninin indüksiyonunun düzenlenmesinde, iki farklı sinyalizasyon yolağı etkilidir. Birinci yolakta, iyonize radyayona (IR) maruz kalmış hücrelerde Gadd45'in indüksiyonu, Gadd45 geninin 3. intronuna lokalize olan tümör süpresör (baskılayıcı) protein p53 aracılığı ile olmaktadır (Kastan *et al.* 1992). IR'a maruz kalmış hücrelerde, Gadd45a geni p53 ile transkripsiyonel olarak aktive olmaktadır (Kastan *et al.* 1992, Zhan *et al.* 1994).

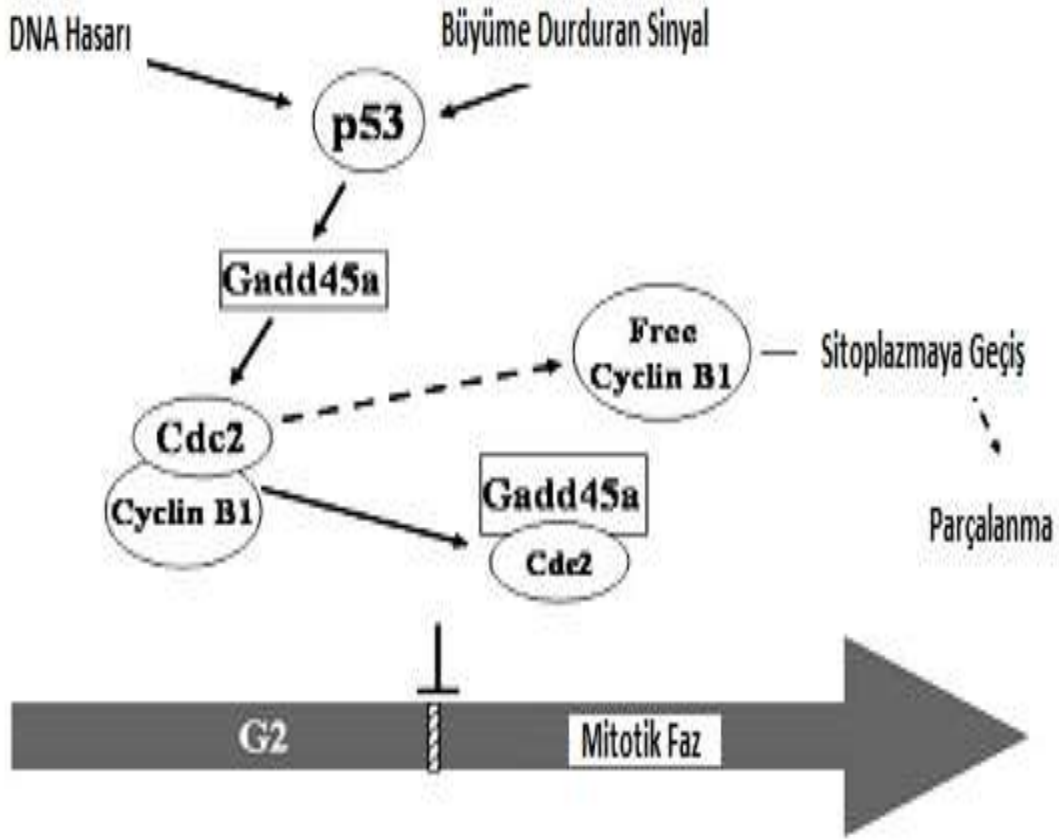
Ayrıca p53, genin promotorunun proksimalinde bulunan tümör süpresör ve transkripsiyon faktörü olan WT1 ile kompleks oluşturarak da, Gadd45 genini transkripsiyonel olarak aktive eder (Şekil 2.6) (Maheswaran *et al.* 1993, Zhan Q. 2005).



Şekil 2.6. Gadd45 proteininin p53 ile düzenlenmesi

İkinci yolakta ise p53'ün normal fonksiyonuna bağlı olmadan Oct-1 ve NF-YA transkripsiyon faktörleri aracılığı ile düzenlenme gerçekleşmektedir. Besin yetersizliği, UV veya MMS gibi DNA'ya zarar veren ya da büyümeyi durduran ajanlara maruz kalmış insan kanser hücre hatlarında, Gadd45 geninin p53 fonksiyonundan bağımsız bir şekilde aktif olduğu bulunmuştur (Zhan *et al.* 1996). Bu yolakta, Gadd45 geninin promotorunun -107 ve -62 bölgeleri arasında bulunan Oct-1 bölgesi ile CAAT kutusu rol oynamaktadır (Jin *et al.* 2001). DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmış hücrelerde, hem Oct-1 bölgesine bağlanan Oct-1 proteininin hem de CAAT kutusuna bağlanan NF-YA proteininin, Gadd45 geninin promotorunu aktive ettiği ve dolayısıyla bu iki transkripsiyon faktörünün, genotoksik strese hücresel yanıtta önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Zhao *et al.* 2000, Fan *et al.* 2002).

Gadd45 proteininin hücre döngüsünde de rol oynadığı bilinmektedir. Gadd45 geninin ekspresyonu ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, hücre döngüsünün G<sub>2</sub> kontrol noktasında aktivasyonu sonucu, insan fibroblast hücrelerinin büyümesinin baskılandığı belirtilmiştir (Zhan *et al.* 1994). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise, Gadd45 proteininin hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan Cdc2-siklin B1 kinaz kompleksi, p21 ve PCNA gibi nükleer faktörlerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Smith *et al.* 1994, Kearsley *et al.* 1995, Zhan *et al.* 1999). Gadd45'in G<sub>2</sub>-M fazını durdurması, hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında G<sub>2</sub>-M fazına geçiş için gerekli olan Cdc2-siklin B1 kinaz protein kompleksinin aktivasyonunu inhibe etmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Gadd45 proteini normalde Cdc2 kinazla etkileşimde bulunmasına rağmen, siklin B1 kinazla etkileşmediği için, Cdc2-siklin B1 kinaz kompleksinden siklin B1'in ayrılarak, siklin B1 proteininin subselüler lokalizasyonunu değiştirerek, Cdc2-siklin B1 kinaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur (Hollander *et al.* 1999, Salvador *et al.* 2002). Jin ve ark.'nın yaptığı çalışmada da, Gadd45 proteininin indüklenmiş ekspresyonu, nükleusta siklin B1 proteininin seviyesinde azalışa sebep olurken, Cdc24 ve Chk1 proteinlerinin fosforilasyon sitelerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı rapor edilmiştir. Bu yüzden, Cdc2 kinaz aktivitesini Gadd45 proteininin baskılamasının, Cdc2-siklin B1 kompleksinin fiziksel olarak birbirinden ayrılmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Zhan Q. 2005).



Şekil 2.7. Hücre döngüsünün G<sub>2</sub>-M kontrol noktasında p53-Gadd45 yolu

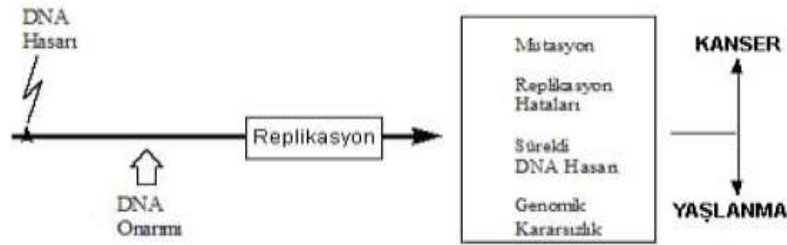
Gadd45'in aynı zamanda apoptozisin indüklenmesine aracılık ettiği bilinmektedir. Genotoksik ajanlara maruz kalmış tümör hücrelerinde, Gadd45'in apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Takekawa *et al.* 1998). Gadd45 geni, MEKK4/MTK1 proteinleri ile etkileşerek JNK/p38 sinyalizasyon yolağını aktive ederek apoptozisin indüklenmesine sebep olur ve Gadd45 aracılığıyla JNK/p38 aktivasyonu için BRCA1 proteini gereklidir (Takekawa *et al.* 1998, Harkin *et al.* 1999). Ayrıca, JNK ve p38 kinaz aktivitesinin sağlanmasında, gadd45'in kritik bir rolü olduğu belirtilmiştir (Hildsheim and Fornace 2002). Gadd45 geninin düzenlenmesi apoptozisin indüksiyonu ile ilişkili olmasına rağmen, genotoksik strese yanıt olarak Gadd45'in apoptozisi aktive edip etmediği hakkında net bir kanıt yoktur.



Son zamanlarda ilgi çeken bir konu da Gadd45 proteininin, DNA tamirinde nasıl biyolojik bir role sahip olduğudur. Gadd45 proteininin, PCNA proteini ile etkileşerek, nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Smith *et al.* 1994). Fakat hala bu durumun tartışmalı olduğu ve aydınlatılması gerektiği bilinmektedir (Kearsey *et al.* 1995). Gadd45 proteininin ekspresyonunun engellenmesinin, DNA tamir oranını değiştirdiği ve DNA'da çapraz bağ oluşturan UV radyasyon veya sisplatin gibi ajanlara maruz kalmış hücrelerin ölümüne duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir (Smith *et al.* 1996, Smith *et al.* 2000, Smith and Seo 2002). Ayrıca Gadd45 proteinlerinin, UV radyasyonun ardından kor histon proteinleri ile direkt etkileştiği ve histon-DNA kompleksinin bozulmasına sebep olduğu (destabilize) belirtilmiştir (Carrier *et al.* 1999). Yapılan bu çalışmalara bağlı olarak Gadd45'in, UV hasarlı kromatin bölgesini tanıyıp bağlandığı ve hücresel proteinlerin DNA'ya girişini değiştirebildiği gösterilmiştir. Fare embriyo fibroblastları (MEF) ile yapılan bir çalışmada da, Gadd45'in kromatin katlanması ve DNA tamiri arasındaki bağlantıya aracılık ettiği gösterilmiştir (Carrier *et al.* 1999).

### 2.3. DNA Tamiri ve Mekanizmaları

DNA'nın nesilden nesile değişmeden kalması, DNA molekülünün doğru olarak kendini replike etmesi ve DNA molekülünde oluşabilen hasarların tamir mekanizmalarıyla onarılmasıyla mümkün olmaktadır (Çulcu 2007). Tüm organizmalar (bakteri, maya, *drosophila*, balıklar ve insanlar dâhil), hücreleri çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA tamir mekanizması içerirler. DNA onarımı, apoptoz, mutasyon, replikasyon hataları, DNA hasarının devamlılığı ve genomik kararsızlık gibi önemli biyolojik mekanizmalarda kullanılır. Bu mekanizmalardaki bir anormallik kansere veya yaşlanmaya yol açar (İnt.Kyn.1, Bütüner ve Kantarcı 2006).



Şekil 2.8. DNA hasarı sonucu oluşan süreç

DNA onarım mekanizmalarından, sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler ve hatalı eşleşme onarımı, baz ve nükleotid kesip çıkarma onarımı ile ilgili genler sorumludur. Bu genlerin yer aldığı DNA tamir mekanizmaları şunlardır:

#### 2.3.1. Direkt Onarım Mekanizması ya da Hasarın Geri Döndürülmesi

##### A. Fotoreaktivasyon

UV ışığa maruz kalma sonucu meydana gelen pirimidin dimerlerinin fotoliz enzimi tarafından yok edilmesi olayına fotoreaktivasyon denir. Fotoliz enzimi ışık enerjisini tutar ve pirimidin dimerlerinin olduğu bölgede DNA'ya bağlanıp, dimerlerin arasındaki kovalent bağları kırarak, zarar görmüş bazları eski haline geri döndürür (Onur *et al.* 2009).

## **B. O-6-metilguanin Onarımı**

Alkilleyici ajanlar varlığında oluşan O-6-metilguanin yüksek oranda mutajeniktir. Alkilleyici ajanlar varlığında meydana gelen bu hasar, O-6-metilguanin metil transferaz enzimi tarafından onarılır. Bu enzim hatalı bazlara bağlı metil (CH<sub>3</sub>) gruplarını kopararak hasarı onarır (Çulcu 2007).

## **C. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu**

Peroksitler ya da X ışınları gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklar meydana getirmektedir. DNA zincirinde meydana gelen basit kırıklar DNA ligaz enzimi tarafından onarılmaktadır. Bu enzim enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3' hidroksil grubu arasında fosfodiester bağını oluşturarak hasarı onarır (Onur ve ark. 2009).

### **2.3.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Onarım Mekanizması**

Bu onarım mekanizması tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunur ve 3 basamakta gerçekleşir:

- 1- Yanlış bölge veya hasar tanınır ve enzimatik olarak nükleaz enzimi tarafından hasarlı bölge kesip çıkartılır.
- 2- DNA polimeraz I enzimi ile oluşan boşluklar doldurulur.
- 3- DNA ligaz enzimi ile de oluşan boşluklar tamamen kapatılır (Zhang *et al.* 2009).

## **A. Baz Eksizyon Onarımı**

Bu onarım mekanizması DNA bazlarının spontan hidrolizi ve kimyasal olarak değişmesi sonucu oluşan hasarın onarımı ile ilgilidir. İlk olarak kimyasal olarak değişen baz, DNA glikozilaz enzimi tarafından tanınır. Bu enzim bazla şeker arasındaki glikozidik bağı kopartarak AP bölgesi oluşturur. Daha sonra bu bölge AP endonükleaz enzimi tarafından tanınır ve AP endonükleaz, AP bölgesinin şeker omurgasında bir çentik oluşturur ve DNA ligaz enzimi ile boşluklar doldurularak hasar onarılır (Çulcu 2007).

## **B. Nükleotid Eksizyon Onarımı**

NER onarım mekanizması ile UV ışığı tarafından uyarılan pirimidin dimerleri ile DNA'daki büyük lezyonlar tanınır. Bu mekanizmada *uvr* gen ürünleri tarafından, DNA'daki lezyonlar tanınır ve hasarlı olan zincir kesilip çıkarılır. Daha sonra DNA sarmalı üzerinde meydana gelen boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve son olarak DNA ligaz enzimi ile birleştirilir (Bütüner ve Kantarcı 2006).

## **C. Yanlış Eşleşme (Mismatch) Eksizyon Onarımı**

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen ve bazların yanlış eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir. Bu mekanizmada görev alan proteinler; mutS, mutL, mutH, *uvrD*, ekzonükleaz I, SSB (tek ipliğe bağlanma proteini) ve DNA polimeraz III'tür. Replikasyon sırasında normal zincir metillenmiş durumdadır. Ancak yeni sentezlenen zincirde metillenme gecikir. Böyle bir durumda, yeni sentezlenen zincirdeki hatalı bazlar mutS tarafından tanınır. Daha sonra mutL ve mutH kompleks oluşturarak sisteme katılır ve DNA boyunca metillenmemiş bölge buluncaya kadar hareket ederler. MutH proteini, metil grubunun karşısında metillenmemiş zincire çentik atarak aktive olur. Metillenmemiş zincir, ekzonükleaz I, SSB ve *uvrD* ile birlikte uzaklaştırılır ve son olarak DNA polimeraz III ile doğru DNA zinciri sentezlenir ve DNA ligaz ile boşluk kapatılarak onarım sona erer (Bütüner ve Kantarcı 2006).

### **2.3.3. Rekombinasyonel Onarım Mekanizması**

DNA replikasyonu sırasında, herhangi bir nedenden kaynaklanan bir lezyon (pirimidin dimeri gibi) varsa, DNA polimeraz lezyonlu bölgeye geldiği zaman duraklar. Daha sonra yeni sentezlenen zincirde boşluk bırakarak onun üzerinden atlar. Buna yanıt olarak RecA proteini, değiş-tokuş işlemi ile hasarsız komplementer zincirde bulunan bir parçayı bu boşluğa transfer eder. Bu işlem diğer zincirde bir boşluk oluşturur. Oluşan bu boşluk, replikasyon sırasında onarım mekanizması tarafından doldurulur (Çulcu 2007).

### **2.3.4. SOS Onarım Mekanizması**

UV radyasyon, alkilleyici ajanlar gibi DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer onarım mekanizmalarının başarılı olmadığı durumlarda devreye giren onarım mekanizmasıdır. Bu mekanizma, DNA sentezi sırasında, lezyonun üzerinden atlamak yerine, lezyon karşısında DNA polimerazın replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Replikasyonun doğruluğundan fedakârlık edildiği için hataya meyilli onarım mekanizması olarak da adlandırılır (Çulcu 2007).

### **2.3.5. DNA Çift Zincir Kırığı Onarım Mekanizması**

DNA çift zincir kırığına sebep olan etkenler, iyonize radyasyon, topoizomeraz inhibitörleri ve V(D)J (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V, D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) rekombinasyondur. DNA çift zincir kırıkları onarılmazsa kromozom kırıklarına ve hücre ölümüne sebep olabilir. Eğer yanlış onarırsa kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur.

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

### **A. Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması (NHEJ)**

Bu mekanizmada DNA-bağımlı protein kinaz enzim kompleksleri, DNA'daki kırık bölgelere bağlandığı zaman, diğer proteinlerin de bu bölgeye gelmelerini sağlar. Daha sonra bu protein komplekslerinin formasyonu ile DNA ligaz enzimi kırık uçların bağlanmasını sağlar. NHEJ onarım yolundaki hatalar, iyonize radyasyona duyarlılığa ve immün yetersizliğe sebep olur (Onur *ve ark.* 2009).

### **B. Homolog Rekombinasyon (HR)**

İyonize radyasyona maruz kalan DNA sarmalının her iki zincirinde de kırık olduğu zaman bu mekanizma devreye girer. Bu mekanizmada hasarlı DNA hasarlı olmayan homolog DNA ile değiştirilir. Her iki zincirde de kırık olduğundan dolayı onarım sırasında komplementer DNA zinciri olarak kullanılacak hatasız atasal bir zincir bulunmamaktadır. Bu yüzden, homolog bölgesinde mevcut olan genetik bilgi, hatalı çift zincir kırığın yerine geçmede kullanılır. Hasarsız homolog bölge rekombinasyonla hasarlı DNA molekülü içine yerleştirilerek onarım gerçekleştirilir (Çulcu 2007).

## 2.4. Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Kullanılan Antioksidanlar

Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız ve moleküler ağırlığı düşük olan moleküllere serbest radikal denir. Başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilen bu moleküller ROS (Reaktif Oksijen Türleri) olarak da adlandırılmaktadır (Çavdar ve ark. 1997). ROS'nin oluşumu; iltihaplanma, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı, ozon (O<sub>3</sub>), azot dioksit (NO<sub>2</sub>), kimyasal maddeler ve bazı ilaçların etkisiyle artar. Serbest radikaller DNA, RNA gibi nükleik asitler ve karbonhidrat, lipit, protein gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek, hücrenin yapı ve fonksiyonunu değiştirebilirler ve dolayısıyla oksidatif strese neden olabilirler.

Hücrelerin ROS'ne karşı en hassas komponentleri lipidlerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, ROS'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir. ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonuna “enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu” denir. Hücre membranlarına lipid peroksidasyonuna uğrayan yağ asitleri poliansatüre (çoklu doymamış yağ asitleri)'dir. Lipid peroksidasyonu, yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması sonucunda yağ asidi zincirinin lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Bu lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksit radikallerine dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipit peroksitleri, geçiş metallerinin katalizi ile yıkıldığı zaman zararlı bileşikler olan aldehitler ortaya çıkar. Bu aldehitler içinde en önemlisi malondialdehit (MDA)'dir. Bu bileşikler ya hücre olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden difüze olarak hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. MDA, hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmektedir.

Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçümü ile lipid peroksidasyonun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu sonucu membran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artması ile membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca iyonlarının girişi artmaktadır. Hücre içi serbest Ca artışına bağlı olarak artan fosfolipaz aktivitesi fosfolipid aktivitesinin artmasına, membran geçirgenliğinde değişiklik ve potansiyel kaybına bağlı toksik etkiye artışa, apoptozisin hızlanmasına ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına yol açmaktadır. Serbest radikallerin bu tür etkileri sonucu pek çok hastalığın oluşabildiği düşünülmektedir (Tietz 1995).

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler ve bunun sonucunda sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Protein karbonilleri sadece proteinlerin direk oksidasyonu sonucunda değil, aynı zamanda indirgeyici şekerler veya poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri ile proteinlerin fonksiyonel gruplarının etkileşimi ile de oluşabilirler. Bunun sonucunda protein-protein çapraz bağları oluşmakta ve albumin ve immünoglobulin G gibi çok sayıda disülfid bağları içeren proteinlerin tersiyer yapıları bozulabilmektedir. Bu şekilde yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler ve enzimatik aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir.

Serbest radikallerin etki ettiği organik moleküllerden bir de karbonhidratlardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliği olduğu için antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden serbest radikallerin kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynadığı düşünülmektedir (Akkuş 1995).



Serbest radikallerin nükleik asitler üzerinde yaptığı hasar oldukça önemlidir. Serbest radikaller özellikle DNA üzerinde sitotoksik etkiye sahiptirler. Ayrıca siklobütan pirimidin dimerleri, dipirimidinler, tek zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağları oluşturarak, DNA polimeraz enzimini inhibe ederler. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nütrofillerden salınan hidrojen peroksitin de membranlardan kolayca geçtiği ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir.

Serbest radikallerin olumsuz etkileri ortadan kaldırılmazsa vücutta ciddi hasarlar meydana gelebilir ve dolayısıyla çeşitli hastalıklara sebep olabilir. Reaktif oksijen bileşiklerini inaktive ederek oksidatif stresi önleyebilen veya geciktiren maddelere antioksidanlar, bu olaya da antioksidan savunma sistemi denir. Son yıllarda ülkemiz dâhil pek çok ülkede, birçok hastalığın tedavisinde antioksidan özelliği olan bitkiler çok kullanılmaktadır. Oksidatif stresin artmasına bağlı olarak organik moleküller zarar görmekte, dolayısıyla kalp hastalığı ve kanser gibi hastalıkların oluşma riski artmaktadır. Serbest oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin tüketilmesi gerekir. Antimutajenik, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok biyolojik fonksiyonlar bu antioksidan bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Cook and Samman 1996). Biyolojik fonksiyonlarda birçok olumlu özelliği kanıtlanmış olan antioksidan bileşiklerden biri de *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilen curcumin'dir.

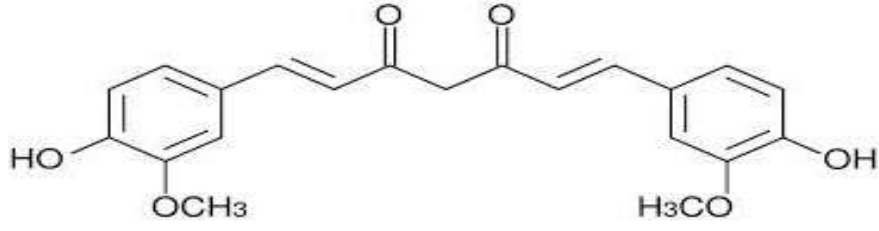
### 2.4.1. Curcumin

Curcumin; Çin ve Hindistan’da yaygın olarak yetiştirilen, Zingiberaceae (Zencefilgiller) familyasına ait, sarı çiçekli ve büyük yapraklı çok yıllık otsu bir bitki olan *Curcuma longa* (Turmerik, Zerdeçal, Zerdeçöp)’nin rizomlarında bulunur (Şekil 2.9) (Limtrakul *et al.* 1997, Scarttezzini and Speroni 2000). Curcumin, yemeklerde sarı renk verir ve baharat olarak kullanılmaktadır.



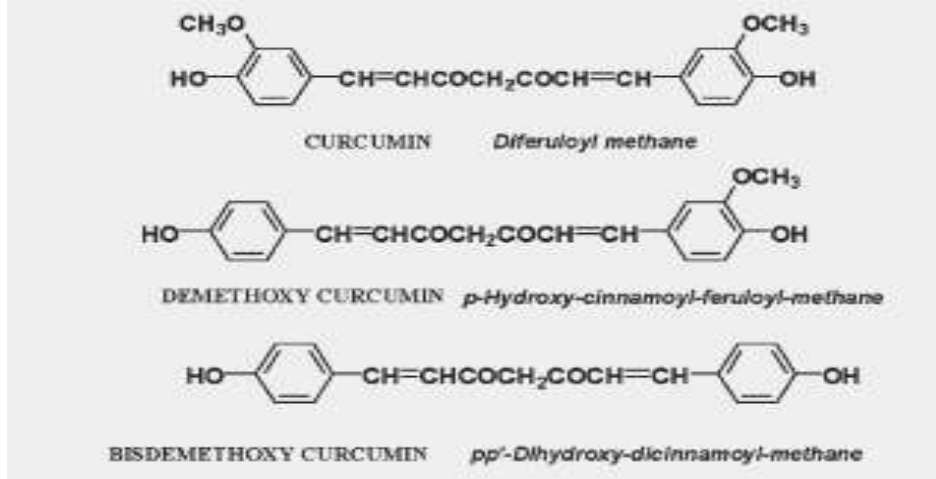
Şekil 2.9. *Curcuma longa* bitkisi

İlk defa 1910 yılında kimyasal olarak kullanılmaya başlanan curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] düşük molekül ağırlıklı polifenol bileşiğidir (Menon and Sudheer 2007). Curcumin 183 °C’de erir, moleküler formülü  $C_{21}H_{20}O_6$  ve moleküler ağırlığı 368,37 g/mol’dür (Menon and Sudheer 2007, Goel *et al.* 2008). Curcumin’in kimyasal yapısında benzen halkaları üzerinde fenolik ve metoksi grupları ile  $\beta$  pozisyonunda bağlanmış 2 keton grubu içerir ve bu yapısı antioksidan özelliğine katkıda bulunur (Şekil 2.10) (Sreejayan and Rao 1996, Maheshwari *et al.* 2006). Curcumin, suda çözünmezken, etanol, metanol, DMSO, alkali, kloroform veya asetik asit gibi organik çözücülerde iyi çözünür (Maheshwari *et al.* 2006, Menon and Sudheer 2007).



Şekil 2.10. Curcumin'in kimyasal yapısı

Curcumin'in özünde, Curcumin (diferuloilmetan), demethoksicurcumin (p-hidroksi-kinnamoil-feruloil-metan) ve bis-demethoksicurcumin (pp'-dihidroksi-dikinnamoil-metan) olmak üzere 3 farklı curcuminoid vardır (Şekil 2.11) (Maheshwari *et al.* 2006).



Şekil 2.11. Curcuminoidlerin kimyasal yapısı

#### 2.4.2. Curcumin'in Metabolizması

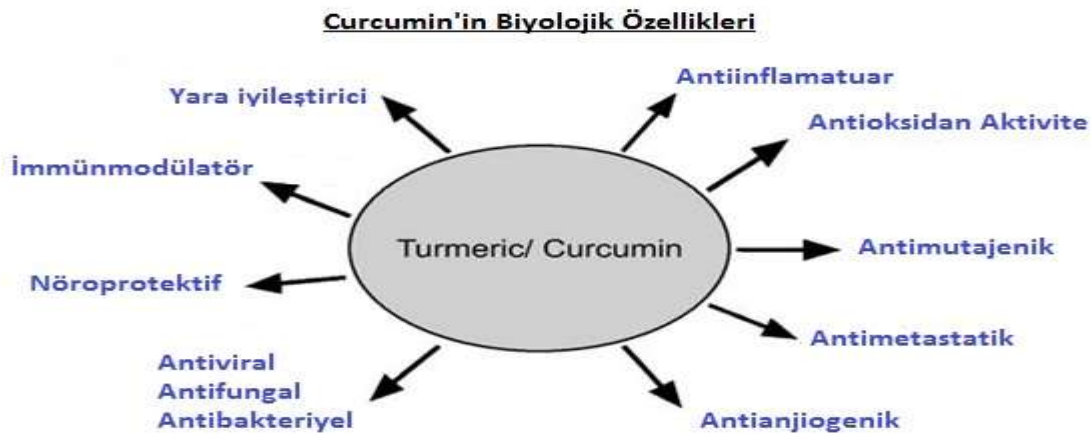
Curcumin suda çözünmediği için hücre membranının hidrofobik ceplerinde lokalize olmaktadır. Moleküler yapısından dolayı, hücreye hızlıca penetre olur ve plazma membranından kolayca geçerek sitozole ulaşır. Sitoplâzmadaki birikmiş olan curcumin çekirdeğe giremez. Plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi yapıların lipofilik özellikte olmasından dolayı, curcumin bu membranöz yapıların içinde daha yoğun bir şekilde bulunur. Curcumin, dolaşımında çok düşük seviyede bulunmakta ya da hiç bulunmamaktadır (Jaruga *et al.* 1998).

Curcumin bağırsaklarda, renksiz ve daha az polar olan tetrahidrocurcumin adlı metabolitine dönüşerek emilir ve buradan tüm dokulara dağılır. Daha sonra karaciğerde glukoronlanarak safra yolu ile atılır (Gautam *et al.* 1998). Oral yolla alınan curcumin'in, yaklaşık % 75'i feçesle, geri kalan kısmı ise idrarla atılır. İntraperitoneal uygulamalarda da vücuttan atılması benzer şekilde olmaktadır, ancak % 11'inin de safrada depolandığı belirtilmiştir.

### 2.4.3. Curcumin'in Biyolojik Etkileri

Curcumin diyetlerde baharat, gıda maddesi ve tekstilde de renk veren bitkisel ajan olarak kullanılmasının yanı sıra birçok hastalıkta da tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Sharma *et al.* 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Curcumin'in birçok farklı farmakolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Aggarwal *et al.* 2006). Curcumin ile ilgili yapılan çalışmalarda, antioksidan (Reddy and Lokesh 1992, Sreejayan and Rao 1994) antikanserojen (Azuine and Bhide 1992, Deshpande *et al.* 1997, Singh *et al.* 1998), antiinflamatuvar (Holder *et al.* 1978) antialerjik, antiviral, antifungal, antibakteriyel (Negi *et al.* 1999) ve serbest radikalleri süpürücü etkisi (Araujo and Leon 2001, Lin and Lin-Shiau 2001, Aggarwal *et al.* 2006, Tohda *et al.* 2006). gibi önemli özellikler gösterdiği belirtilmiştir (Şekil 2.12).



2.12. Curcumin'in biyolojik özellikleri

### 2.4.3.1. Curcumin'in Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkisi

Oksidatif stresin, kalp hastalığı, diyabet, nöronal hücre hasarı ve kanser gibi birçok hastalığın oluşumunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Curcumin kuvvetli bir antioksidan aktiviteye sahip bir ajandır ve curcumin'in bu özelliği C ve E vitaminleri ile karşılaştırılabilir. Curcumin, hidroksil radikalleri, azotdioksit radikalleri ve süperoksit anyon radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında kolaylaştırıcı etkiye sahiptir (Reddy and Lokesh 1992, Sreejayan and Rao 1994). Birçok hayvan modelinde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Reddy and Lokesh 1992, Sreejayan and Rao 1994). Curcumin'in apoptozisle ilgili genlerin ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür (Jones *et al.* 2000). Curcumin'in diyetle birlikte alınması sonucunda, nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer hastalığından korunmada yararlı olabileceği gösterilmiştir (Calabrese *et al.* 2003). Sıçanlarda curcumin'in nörokoruyucu etkisinin, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi, antioksidan savunma enzimlerini artırması ve peroksinitrit oluşumunu azaltmasına bağlı olduğu belirtilmiştir (Thiyagarajan and Sharma 2004). Ayrıca farelerde streptozosinle oluşturulmuş diyabette, curcumin'in serbest oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı bilinmektedir (Sajithlal *et al.* 1998, Majithiya *et al.* 2005). Ayrıca curcumin'in, Araşidonik asit, Tromboksan ve Prostaglandin metabolizmasının anahtar enzimleri olan Cox-1 ve Cox-2'nin uyarımını baskılaması sonucunda, inflamatuvar prostoglandinlerin sentezi baskılanmıştır (Khafif *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1999).

Sonuç olarak oksidatif strese bağlı olarak oluşan birçok hastalığın tedavisinde curcumin'in koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir ve bu koruyucu etkisinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir.

#### **2.4.3.2. Curcumin'in Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi**

Curcumin, Hindistan'da halk arasında böcek ısırması, deri hastalıkları, yaralanma ve suçiçeği gibi hastalıkların tedavisinde yerel ilaç olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda da curcumin'in yarayı tedavi etmede etkili olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, curcumin'in makrofaj, nötrofil ve fibroblast hücrelerinden bol miktarda difüze olduğu gösterilmiştir (Sidhu *et al.* 1998).

Doku tahribatında; hücre bölünmesi, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris proteinleri rol oynamaktadır. Doku ve yaraların iyileşme süreci ise; inflamasyon, granülasyon ve doku yenilenmesi gibi aşamalardan oluşmaktadır.

Curcumin biyolojik aşamaların düzenlenmesinde gerekli olan büyüme faktörlerinin potansiyel kaynağını göstermektedir ve büyüme faktörlerinin de yara iyileşmesinde önemli olduğu bilinmektedir. Curcumin, fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen ve fibronektin ekspresyonunu uyarır ve buna bağlı olarak canlı ortamdaki granülasyon dokunun oluşum oranı artar. Yara iyileşmesinde curcumin tedavisi ile fibronektin seviyesi artar ve kollajen ekspresyonu hızlanır (Sidhu *et al.* 1998). Ayrıca curcumin'in yara iyileşmesinde antioksidan rolünün, keratonist ve fibroblastlardaki hidrojen peroksitin sebep olduğu zararı önlemesiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Phan *et al.* 2001). Başka bir çalışmada ise, curcumin'in hem oral hem de intraperitoneal uygulamaları sonucunda gastrik ülseri engellediği belirtilmiştir (Swarnakar *et al.* 2005). Sonuç olarak yapılan çalışmalarda, curcumin'in yara tedavisinde potansiyel bir iyileştirici bitkisel ajan olduğu belirtilmiştir.

#### **2.4.3.3. Curcumin'in Angiogenezi Düzenleyici Etkisi**

Angiogenesis; yeni vasküler kılcal damarların büyümesine sebep olan fizyolojik bir olaydır. Bu fizyolojik olayda embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve kemik onarımı gibi süreçler etkili olmaktadır. Kontrolsüz angiogenesisin ise, tümör büyümesi, diyabet, eklem iltihabı ve kireçlenme gibi patolojik durumların ortaya çıkmasında ilişkili olduğu bilinmektedir. Tümörlerin gelişmesinde angiogenesisin rolü olduğu ve bu durumun diğer organlara etki ettiği gösterilmiştir (Thaloor *et al.* 1998).

Ayrıca yapılan çalışmalarda curcumin'in angiogenezi engellediği gösterilmiştir (Shim *et al.* 2002). Aynı etkiler curcumin'in analoglarında da gözlenmiştir. Bu etkinin, curcumin analoglarının angiogeneze ilişkili olan genlerin aşırı ekspresyonunu azaltmasından olduğu düşünülmektedir (Mohan *et al.* 2000, Hahm *et al.* 2004).

Curcumin ve analoglarının tümörlü dokularda, metalloproteinazları inhibe ederek angiogenezi azalttığı gösterilmiştir (Robinson *et al.* 2003).

#### **2.4.3.4. Curcumin'in Antikanser Etkisi**

*In vivo* ve *in vitro* olarak deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda curcumin'in, kolon, onikiparmak bağırsağı, mide, yemek borusu ve ağız kanserlerinde, tümöre karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Azouine and Bhide 1992, Deshpande *et al.* 1997, Singh *et al.* 1998). Hindistan'da bağırsak kanserine nadir rastlanılmasının sebebinin, curcumin'in halk arasında yaygın bir şekilde kullanımına bağlanmaktadır. Curcumin'in bu antikanserojenik etkisinin moleküler temelinde, transkripsiyon faktörleri, adhezyon molekülleri, apoptotik genler, angiogenezin düzenlenmesinde rol oynayan genler ve hücre sinyal molekülleri olduğu belirtilmektedir (Chan 1995, Shim *et al.* 2002). Farelerle yapılan bir çalışmada curcumin bileşiklerinin güçlü bir sitotoksik etki gösterdiği ve tümörü önemli bir oranda inhibe ettiği gösterilmiştir (Rubby *et al.* 1995). Ayrıca sentetik curcumin'in de lenf kanseri ve farklı tümör çeşitlerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Kawamori *et al.* 1999).

#### **2.4.3.5. Curcumin'in Antimikrobiyal Etkisi**

Gıdalarda ve tekstil ürünlerinde renk verme amacının dışında *E.coli* ve *S.aureus* organizmalarında bakterisidal etkinlik gösterdiği gözlenmiş ve bu etkisi mikrobiyolojik olarak da kanıtlanmıştır. Ayrıca İnsan İmmün Sistem Yetersizliği (HIV) Tip 1 ve Tip 2 hastalığında da, antiviral, antifungal, antimalaryal ve antiprotozoal etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Ammon and Wahl 1991, Li *et al.* 1993, Rasmussen *et al.* 2000).

## 2.5. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

DNA hasarı maya, bitki, hayvan ve insanlar da dâhil olmak üzere çeşitli organizmalar üzerinde çalışılmaktadır. DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir. Normal DNA metabolizması sırasında meydana gelen DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden oluşan değişimlerdir. DNA hasarına neden olan çevresel faktörler ise, fiziksel veya kimyasal ajanlardır (Dinçer ve Kankaya 2010). DNA hasarına sebep olan kimyasal ajanların, organizmalar üzerindeki genotoksik veya mutajenik etkilerini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; tek hücre jel elektroforezi (Comet assay), mikronukleus (MN), kromozomal aberasyon testi (CA), SCE, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), TUNEL, floresans in situ hibridizasyon (FISH), immünokimyasal yöntemler, ELISA, kromatografi gibi yöntemlerdir (Kumari *et al.* 2008).

### 2.5.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Comet Assay)

DNA hasarı ilk kez 1978 yılından Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir. Daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından mikro jel elektroforez yöntemi geliştirildi (Ostling and Johanson 1984). Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamalarının üzerindeki agaroz jele gömülür, yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlandıktan sonra nötr pH ortamında kısa bir elektroforez uygulanır. Ancak nötr ortamda çift sarmal kırıkları tespit edilip, tek sarmal kırıkları tespit edilemediği için, elektroforez kuvvetli alkali ortamda (pH>13) uygulanmıştır (Singh *et al.* 1988). Günümüzde uygulanmakta olan “Comet Assay” tek ve çift zincir kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir (Singh *et al.* 1988).



Comet yönteminin en önemli avantajı, çeşitli hücre tiplerinde çalışılabilmesidir. Ayrıca basit, hızlı, duyarlı olması, radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasarının tespitinde çok tercih edilen bir yöntemdir (Tice *et al.* 2000). Ancak avantajları olduğu kadar tek hücre verisi, küçük hücreli numune, uygulama esnasında dikkat ve el becerisi gerektirmesi ve sonuçların yorumlanması gibi dezavantajları da olabilir (Dhawan *et al.* 2009).

Comet yönteminin uygulanmasında ilk önce, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA ince bir agaroz jelin içerisine fikse edilir, daha sonra DNA'nın süperkoil yapısının açılması ve kırıkların ortaya çıkabilmesi için alkali ortamda lizis işlemi gerçekleştirilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli fiziksel veya kimyasal ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları tarafından onarılmamış, tek veya çift zincirlerinde kırıklar oluşmuş ise farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip olan kırılmış DNA molekülleri farklı hızlarda göç ederler. Son olarak elektroforetik ortamda yürütülen DNA molekülleri, DNA'ya spesifik olan etidiyum bromür gibi boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelenir. Mikroskop altında dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar 0-4 arası rakamlar verilerek hasar derecelendirilir. Ayrıca kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesine de bakılarak sonuçlar değerlendirilir (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

### **2.5.2. Mikronukleus (MN) Yöntemi**

Kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin anlaşılmasındaki en önemli kriterlerden biri de MN oluşturabilme yeteneğidir. Bu teknik, kromozom anormalliklerine neden olan genotoksik ajanların etkisini araştırmak için geliştirilen bir tekniktir. MN'ler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik içteki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanırlar. MN oluşumunun temelinde DNA hasarı vardır (Şekeroğlu 2011).

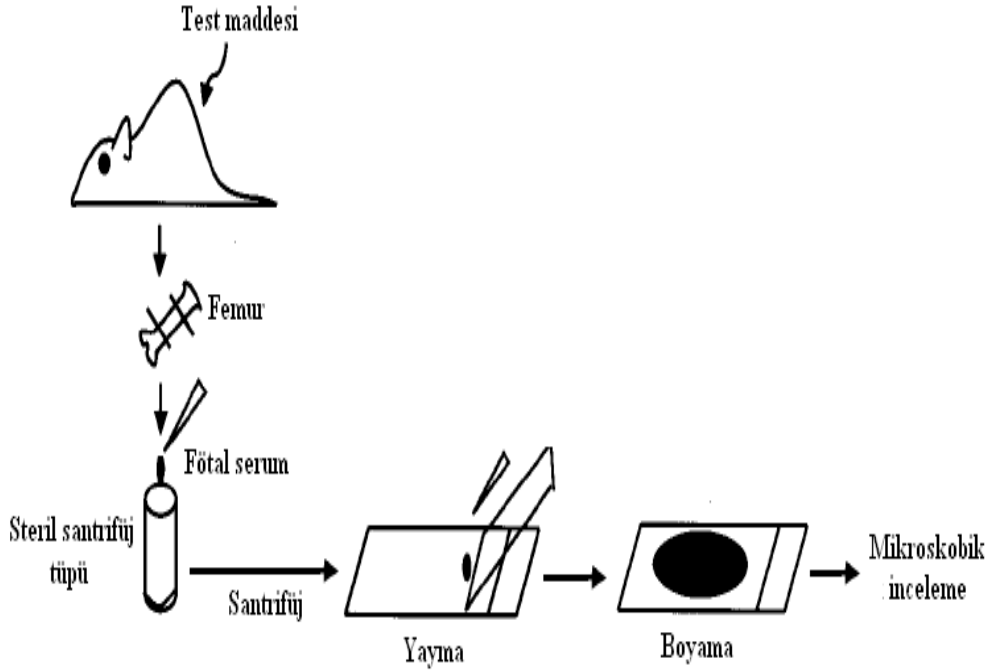
MN yöntemi, mitoz ile oluşan tüm hücre çeşitleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir (Stoper and Müler 1997, Volders et al. 1997). *In vitro* MN yönteminde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitoz bölünmeden 44. saat önce sitokinezi inhibe etmek için sitokalsin-B eklenir ve bir hücre döngüsünü tamamlayan binükleatlı (çift nükleuslu) hücrelerin oluşması sağlanır. İnkübasyon süresinin sonunda, kültürler protokollere uygun olarak pasajlanır ve binükleat taşıyan MN'lerin oranı tespit edilir (Fenech and Morley 1986, Krishna and Hayashi 2000). *In vivo* Mn testinde ise, *in vitro* test sistemlerinden elde edilen mutajenik etkinin daha detaylı araştırılması ve bileşimin *in vivo* metabolizması, farmakokinetiği ve DNA onarım aşamaları gibi faktörlerin de değerlendirilmesi sağlanır (Schmid 1975, Krishna and Hayashi 2000). *In vivo* MN testi ile genellikle, kemik iliği ve/veya periferel kan hücrelerindeki polikromatik (PCE, olgunlaşmamış eritrosit)'lerdeki MN oluşumunun analizi yapılmakta ve test edilen bileşimin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı belirlenmektedir (Şekeroğlu 2011).

Kemik iliği yetişkin kemiricilerde temel hematopoietik bir dokudur. Hematopoietik hücrelerin çoğalması sırasında çeşitli kimyasal maddelerin uygulanması, kromozom hasarına veya mitoz bölünmenin engellenmesine yol açmaktadır. Eritropoezis sırasında son mitoz bölünmeden sonra, kemik iliğindeki eritroblastlar PCE'lere dönüşürken çekirdeklerini kaybederler ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplâzma MN oluşumuna neden olur. *In vivo* MN çalışmalarında periferel kan daha az değişkenlik gösterdiği için daha iyi çalışılmaktadır. Fakat kemirgenlerde dalak, MN taşıyan PCE'leri seçici olarak uzaklaştırdığı için, kemirgenlerde dolaşım kanı yerine kemik iliği tercih edilmektedir.

Fare kemik iliğinde MN testi ilk olarak 1970'de Schmid tarafından kullanılmıştır. MN testi, kimyasal ajanların etkisiyle kromozomal hasardan kaynaklanan MN'un belirlenmesi esasına dayanır. Oluşan MN sitoplâzma kalır. Oluşan MN'lerin şekli yuvarlaktır, bazen oval, halka ya da badem şeklinde olabilir ve MN'un çapı, eritrosit nükleusunun yarısından daha az olmalıdır (Schmid 1975).

Fare kemik iliği MN yönteminde eritrositler kullanılır. Oluşan MN yüzdesini belirlemek için PCE ve NCE (normokromatik eritrosit) kullanılır (Vijayalaxmi and Veru 1999). PCE; tam olarak gelişmemiş, olgunlaşmamış, gelişimin ara safhasında ve ribozomları olan eritrosittir. NCE ise, olgun, ribozom içermeyen ve periferel döngüde yaklaşık 1 ay kalabilen eritrosittir (Mavournin *et al.* 1990). Bu iki eritrosit boyanma özelliklerine bağlı olarak mikroskopta kolaylıkla ayırt edilebilirler. PCE'ler May Grunwald-Giemsa boyası ile maviye boyanırken, akridin orange boyası ile kırmızıya boyanırlar. NCE'ler ise, May Grunwald-Giemsa ile kırmızı renge boyanırken, akridin orange ile boyanmazlar.

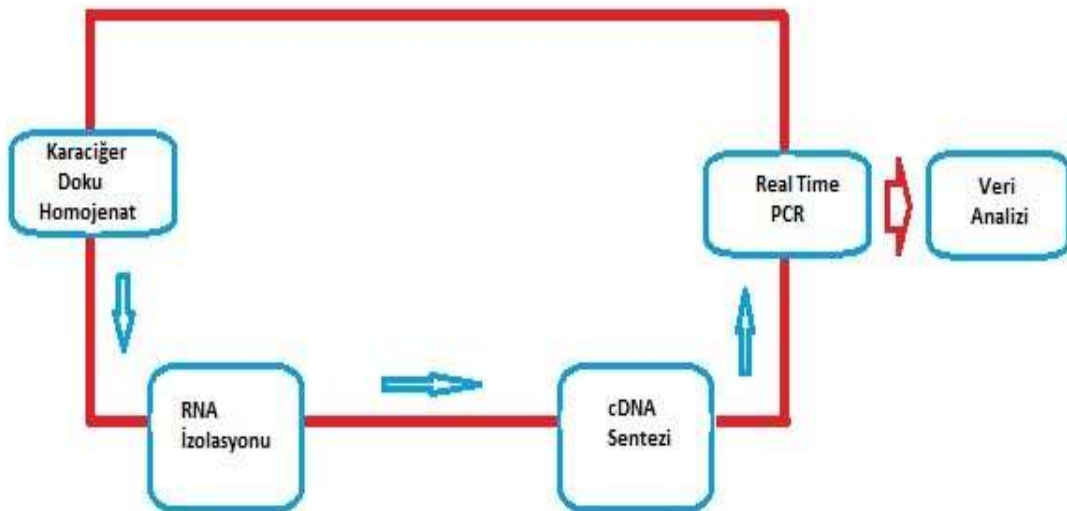
Uygulanan kimyasal ajanın kemik iliği hücrelerinde toksik etki gösterip göstermediğini anlamak için, PCE ile NCE arasındaki orana bakılır. Kimyasal ajan uygulanan hayvanlarda, PCE/NCE oranının kontrol grubuna göre önemli derecede azalması, uygulanan kimyasal ajanın kemik iliği hücrelerine ulaştığını, nükleuslu hücrelerin bölünmesini ve olgunlaşmasını engelleyerek eritrosit oluşumunu azalttığının ve dolayısıyla toksik etki oluşturduğunun göstergesidir (Şekil 2.13) (Cicchetti *et al.* 1999, Yener ve Dikmenli 2009).



Şekil 2. 13. Fare kemik iliğinde *In vivo* MN protokolü

### 2.5.3. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (Real Time PCR -QRT PCR)

RT-PCR; hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen revers transkriptaz enzimi vasıtasıyla komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi ve sonrasında PCR yöntemi ile eksponansiyel olarak çoğaltılarak gen ekspresyonu analizlerinin yapıldığı hızlı ve hassas bir yöntemdir (Şekil 2.14) (Okutucu ve Pehlivan 2003). RT-PCR teknolojisi, DNA ya da mRNA örneklerinin çoğaltılmasını ve oluşan ürünlerin miktarını son zamanlarda tek bir tüpte belirleyebilen popüler bir metot haline gelmiştir (Gibson *et al.* 1996). PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanılması sonucunda, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma tekniğidir. Aynı zamanda bu yöntem, “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi farklı adlarla da bilinmektedir (Bustin 2000). Bu yöntem ile küçük örneklerden hatta tek bir hücreden bile izole edilen RNA izlenebilir (Açılan 2010). Bu yöntemin en çok kullanım alanları arasında, biyolojik örneklerden izole edilen DNA ve mRNA'nın düzeyinin sayısal olarak belirlenebilmesidir. Ayrıca tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, tek nükleotit polimorfizm (SNP) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır (Kubista *et al.* 2006).



Şekil 2.14. RT-PZR akış şeması

RNA'nın bulunduğu ve en çok çalışıldığı örnekler; kan, serum, hücre kültürleri, bitkisel ya da hayvansal dokular ve bakteri kültürleridir (Okutucu ve Pehlivan 2003). Gen ekspresyonu analizlerinde ilk adım çalışılacak örneklerden RNA'nın izole edilmesidir. RNA izolasyonunda en önemli nokta, ribonükleazlar çok kararlı ve hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymayan aktif enzimler oldukları için, ribonükleazların denatüre olduğu kimyasal bir ortamda hücreyi parçalamak gerekir. Bu yüzden RNA çalışmaları steril kabinde yapılmalı, buz üzerinde çalışılmalı, steril ve filtreli pipet uçları kullanılmalı ve derideki RNaz'lar RNA'ların çabuk parçalanmasına sebep oldukları için mutlaka eldiven kullanılmalıdır. RNA izolasyonu 4M guanidyum izotiyosiyanat içeren bir çözeltide fenol-kloroformla birlikte organik faz oluşturularak veya ticari olarak satılan RNA izolasyon kitleri ile yapılabilir. RNA izolasyonundan sonraki aşama, cDNA sentezidir. İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılması gerekir.

Bu yüzden RNA'nın kalitesi ve miktarı spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra, RNA örneklerinin bozulmamış olduğunun formaldehit içeren agaroz jelde görüntülenmesi gerekir. cDNA, mRNA'nın analizi için sentez edilir. cDNA sentezi; RNaz'sız bir ortamda retrovirüslerden elde edilen revers transkriptaz, deoksiribonükleotid trifosfatlar ve random-hekzamer primerler, oligo d(T) primerler veya gen spesifik primerler (GSP) kullanılarak gerçekleştirilir. Sentezlenen cDNA'nın 1/10'u PCR döngüsü için kullanılırken, geri kalan cDNA örnekleri ise - 80 °C'de saklanmalıdır.

RT-PCR işlemi iki ya da tek adımda gerçekleşebilir. İki adımlı RT-PCR tek RNA örneğinden çoklu mesajların belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, tek zincirli cDNA random hekzamer, oligo d(T) veya GSP'lerle eşleşir. RT-PCR'ın iki adımda gerçekleşmesinin avantajı, amplifikasyon enziminin ve primerlerin seçilebilmesi, tek RNA örneğinden farklı mesajların belirlenebilmesi ve kantitasyonuna uygun olmasıdır. Tek adımlı RT-PCR'da ise revers transkripsiyon ve PCR tek tüpte optimize şartlarda gerçekleştirilir ve fazla miktarda RNA örneği varken daha kullanışlıdır. Tek zincirli cDNA GSP ile eşleşir. Daha az pipetleme, daha az kontaminasyon riski olduğu için kantitatif PCR'a daha uygundur (Okutucu ve Pehlivan 2003).

RT-PCR işleminde; çift iplikli DNA'ya bağlandığında floresans artış gösteren ve PCR'ı engellemeyen SYBR Green gibi özgül boyalar kullanılır. Böyle bir boyayı kullanmanın avantajı ve dezavantajı, boyanın PCR sırasında herhangi bir çift iplikli DNA'ya bağlanmasıdır. Ekonomik ve basit olmasından dolayı tercih edilen bir boyadır. Boya çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak SYBR Green miktarı da artar ve bu durum PCR cihazı tarafından belirlenir. PCR ürünlerinin toplam sinyalinin background sinyalini geçtiği an Ct (threshold cycle) değeri olarak bilinir. RT-PCR'da kesin ve relatif olmak üzere iki farklı şekilde miktar tayini yapılır. Kesin miktar tayini, miktarı bilinen RNA örneği ile yapılır. Bu miktarı bilinen RNA örneğinden farklı dilusyonlar hazırlanır. Konsantrasyonu en fazla olan RNA eksponansiyel büyüme fazına en erken, konsantrasyonu en az olan RNA ise en son girecektir. Bütün konsantrasyonlardan elde edilen Ct değerleri ile standart grafik çizilir ve grafik formülünden bilinmeyen örneklerdeki gen ekspresyon miktarları (cDNA kopya sayısı) hesaplanır. Eğer relatif miktar tayini yapılacak olursa, farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen bir referans gen (housekeeping gen) kullanılır. Hem hedef gen hem de referans gen ile PCR yapılır ve hedef gen referans gene göre normalize edilir (Açılan 2010).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan Cihazlar**

1. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
2. Floresan mikroskop (Olympus)
3. Işık mikroskobu (Olympus)
4.  $\pm 4$  °C Buzdolabı (Profilo)
5. -20°C Derin dondurucu (Uğur)
6. -80°C derin Dondurucu (Uğur)
7. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
8. Vorteks (Nüve NM 110)
9. Pipetler (0,5-2  $\mu$ L, 0,5-100  $\mu$ L, 50-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L, 1-5 mL) (Gilson)
10. Hassas terazi (Sartorius)
11. Distile su cihazı (Nüve)
12. Elektroforez düzeneği (Biolab)
13. Hotplate (Thermolyne)
14. pH metre (Hanna Instruments)
15. Lam (IsoLab)
16. Lamel (IsoLab)
17. Homojenizatör (Ultra Turrax)
18. Mikro santrifüj (Stratagene)
19. Karıştırıcı (Labart)
20. Kaynar su banyosu (WiseCircu)
21. NanoDrop Cihazı (ND 1000)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Curcumin (*Curcuma longa*) (Sigma)
2. Methyl methanesulfonate (Sigma)
3. Cyclophosphamide (Sigma)
4. Normal erime noktasına sahip (NMPA, 65 °C) agaroz jel (Sigma)
5. Düşük erime noktasına sahip (LMPA, 37 °C) agaroz jel (Sigma)
6. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
7. Sodyum klorür (Merck)
8. Potasyum klorür (KCl) (Merck)
9. Trizma base (Sigma)
10. Triton X-100 (Sigma)
11. Sodyum hidroksid (Merck)
12. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
13. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
14. Etidyum bromür (Sigma)
15. Trizma HCl (Sigma)
16. Histopak-1077 (Sigma)
17. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Carlo Erba)
18. Fetal calf serum (Sigma)
19. Nitrik asit (Merck)
20. Methanol (Merck)
21. May Grunwald boyası (Sigma)
22. Giemsa boyası (Sigma)
23. Entellan (Sigma)
24. RNAlater® (Sigma)
25. Trizol Reagent (RNA İzolasyon Kiti) (Invitrogen)
26. Ethanol (Merck)
27. İzopropanol (Merck)
28. Kloroform (Merck)
29. ThermoScript™ RT-PCR (cDNA Sentez Kiti) (Invitrogen)
30. Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Tech)



31. Ultrapure Dnase/Rnase Free Water (Life Tech)
32. Total Antioxidant Status (TAS) Kiti (Rel Assay Diagnostics)
33. Total Oxidant Status (TOS) Kiti (Rel Assay Diagnostics)

### **3.1.3. Hayvan Materyali**

Çalışmada Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen, 8-10 haftalık, ağırlıkları 20-40 gram (g) arasında değişen (ortalama 30 g) 54 adet Swiss webster erkek fare kullanıldı. Her biri 6 fare içeren, biri pozitif kontrol, diğeri negatif kontrol olmak üzere, toplam 9 grup oluşturuldu. Deneysel süresi boyunca tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 saat karanlık/aydınlık ortamda) altında, günlük içme suyu ve ticari olarak satılan fare yemi ile beslendi. 1 haftalık adaptasyon süresinden sonra deneye başlandı.

DNA hasarı (genotoksisite) oluşturmak amacıyla, kontrol gruplarındaki denekler hariç, diğere uygulama gruplarındaki deneklere Franke ve ark. (2005)'nin çalıştığı dozlarda 40mg/kg MMS (Sigma) ve 25 mg/kg CP (Sigma) olarak 500 µl dH<sub>2</sub>O içinde çözdürülerek intraperitoneal (i.p) olarak verildi.

DNA hasarını önleyebilmek amacı ile 1. ve 3. gruptaki denekler hariç, diğere gruptaki deneklere Kürkçü (2008)'ye göre curcumin dozu 100 mg/kg olacak şekilde 20 ml Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözdürülerek intragastrik (i.g) yoldan gavajla verildi.

### **3.1.4. Deneysel Gruplarının Oluşturulması**

**Grup 1 (Kontrol Grubu):** Bu gruptaki deneklere sadece su ve yem verildi.

**Grup 2 (Negatif Kontrol Grubu):** 24 ve 48 saatlik etkilerine bakılması için bu gruptaki deneklere sadece i.g olarak 100 mg/kg curcumin verildi.

**Grup 3 (DMSO Grubu):** Curcumin DMSO içinde çözdürüldüğünden bu gruba curcumin dozu ile aynı oranda DMSO verildi.

**Grup 4 (Curcumin + MMS Grubu):** Bu gruptaki deneklere curcumin'in koruyucu etkisine bakılması için, önce i.g olarak 100 mg/kg curcumin verildi ve 24. saat sonunda kuyruk veninden kan alındı. Daha sonra i.p olarak 40 mg/kg MMS verildi ve 48. saatin sonunda kuyruk veninden kan alındı.

**Grup 5 (Curcumin + CP Grubu):** Bu gruptaki deneklere curcumin'in koruyucu etkisine bakılması için, önce i.g olarak 100 mg/kg curcumin verildi ve 24. saat sonunda kuyruk veninden kan alındı. Daha sonra CP'in 48 saatlik etkisine bakılması için i.p olarak 25 mg/kg CP verildi ve 48. saatin sonunda kuyruk veninden kan alındı.

**Grup 6 (MMS + Curcumin Grubu):** Bu gruptaki deneklere önce i.p olarak 40 mg/kg MMS verildi ve 24. saatin sonunda kan alındı. Daha sonra curcumin'in tamir edici özelliğine bakılması için i.g olarak 100 mg/kg curcumin verildi ve 48. saatin sonunda kan alındı.

**Grup 7 (CP + Curcumin Grubu):** Bu gruptaki deneklere önce i.p olarak 25 mg/kg CP verildi ve 24. saatin sonunda kan alındı. Daha sonra curcumin'in tamir edici özelliğine bakılması için i.g olarak 100 mg/kg curcumin verildi ve 48. saatin sonunda kan alındı.

**Grup 8 (MMS Grubu):** Bu gruptaki deneklere sadece i.p olarak 40 mg/kg MMS verildi ve 24 ve 48. saatlerin sonunda kuyruk veninden kan alındı.

**Grup 9 (CP Grubu):** Bu gruptaki deneklere sadece i.p olarak 25 mg/kg MMS verildi ve 24 ve 48. saatlerin sonunda kuyruk veninden kan alındı.

24. ve 48. saatlerin sonunda alınan kan örneklerinin bir kısmında DNA hasarını tespit edebilmek için Comet assay yöntemi yapıldı. Diğer kan örnekleri ise 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazmalar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, OSI (TOK/TAK oksidatif stres indeksi) düzeylerinin belirlenmesi için -20°C'de saklandı.

### 3.1.5. Doku Örnekleri ve Kemik İliğinin Alınması

Tüm gruptaki deneklere etken maddelerin uygulama işlemi sona erdikten sonra, tüm denekler kas içi 5-10 mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®) ile anestezi altına alındı. Anesteziyi takiben, açıklığı karın sol tarafa bakan C şeklinde geniş bir kesi ile karın açıldı. Karaciğerden doku örneği alınıp, içinde RNaz enziminin aktivitesini inhibe eden RNAlater solüsyonu bulunan ependorf tüp içerisine konuldu ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden gadd45 ve gadd153'ün mRNA'larının ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile incelenmek üzere - 20° C'de saklandı. Daha sonra hayvanlar anestezi altındayken kemik iliğinde mikronukleus indeksinin belirlenmesi için servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp femur kemikleri çıkardı. Çıkarılacak kemikler kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirildi. İki ucundan kesilerek pens ile tutularak her femura ait kemik iliği içerisinde 1 ml sığır serumu ihtiva eden enjektör ile santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu işlem yine 1 ml sığır serumu ihtiva eden enjektör ile diğer ucundan da verilerek kemik iliğinin tamamının santrifüj tüpüne aktarılması sağlandı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Tek Hücre Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

**Lizis Solüsyonu:** Stok lizis solüsyonu 100 mM EDTA, 2,5 M sodyum klorür, 10 mM trizma base'den oluşmaktadır. Stok solüsyonun pH'sı değiştirilmedi. Bu stok solüsyondan 100 mL çalışma solüsyonu hazırlandı. % 1 oranında triton X-100 ve % 10 oranında DMSO jöjeye alınarak üzeri stok solüsyonla 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra çalışma solüsyonunun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı.

**Elektroforez Tamponu:** Alkali elektroforez çözeltisi 1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit tartılıp 500 mL'ye tamamlandı ve pH < 13 olacak şekilde ayarlandı.

**PBS (Fosfat) Solüsyonu:** 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  solüsyonları hazırlandıktan sonra bir beher içinde pH 7,2 olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan tampon solüsyonuna 0,15 M NaCl eklendi.

**Boyama Solüsyonu:** 10 mg etidyum bromür 50 mL distile suda çözülerek 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik stok etidyum bromür çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 mL alınıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

**Normal Erime Noktalı Agaroza (NMPA) Çözeltisi:** 0,02 gr NMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayıldı.

**Düşük Erime Noktalı Agaroza (LMPA) Çözeltisi:** 0,01 gr LMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ısıtılarak % 0,5'lik LMPA çözeltisi hazırlandı.

**Nötralizasyon Solüsyonu:** 48,5 mg Tris 750 mL distile suda çözülüp pH 7,5'e ayarlandı. Distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı (Koçyiğit *et al.* 2005).

### 3.2.2. Mononükleer Lökositlerde DNA Hasarının Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği ile *In vitro* Tayini

1. Tüm gruptaki deneklerin kuyruk venlerinden yaklaşık 2-3 ml kan alındı.
2. Daha sonra ependorf tüplerin içerisine histopak konuldu ve alınan kanlar 1:1 oranında olacak şekilde tüplerin içerisine eklendi.
3. Oda ısısında 2000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
4. Santrifüj işlemi sonunda histopak üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde yer alan lökositler pastör pipeti yardımıyla yeni ependorf tüplere alındı.
5. Daha sonra üzerlerine yıkama amaçlı PBS eklenerek 2300 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
6. Süre sonunda süpernatant atılarak dipteki hücre yoğunluğuna göre 0,5-1 mL PBS eklenip pastör pipetiyle yavaşça karıştırılarak homojen bir çözelti olması sağlandı.
7.  $37\pm 0,5$  °C'de eritilmiş 75 µL % 0,5'lik LMPA, 25 µL hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dk bekletilerek agarın polimerleşmesi sağlandı. Agar üzerindeki lamel dikkatli bir şekilde alındı.
8. Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
9. Daha sonra elektroforez işlemi için, elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
10. Lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi ve 20 dk akım uygulanmadan bekletildi.
11. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dk elektroforez uygulandı.
12. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamlar 5 dk distile suda bekletildi.
13. Takiben lamlar 15 dk nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
14. Lamların üzerine 60 µL 20 µg/mL konsantrasyonda olan etidyum bromür çözeltisi ilave edildi.
15. Her lamda 100 hücre floresan mikroskopunda değerlendirilerek DNA hasar derecesi görsel olarak değerlendirildi (Singh *et al.* 1988, Tice *et al.* 1990).

### 3.2.3. Mikronukleus Yönteminde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

**Nitrik Asit (HNO<sub>3</sub>) Çözeltisi:** 7 ml HNO<sub>3</sub> ve 93 ml distile su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı. Bu çözelti lamaları temizlemek amacıyla kullanıldı.

**Sorensen Tampon Çözeltisi:** Bu tampon çözeltisi Tampon A ve Tampon B olmak üzere iki stok çözelti olarak hazırlandı ve oda ısısında saklandı. Bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı. Bu tampon çözeltisi Giemsa çözeltisi hazırlanırken de kullanıldı.

**Tampon A:** 4,53 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. pH'ı 4,8'e ayarlandı.

**Tampon B:** 5,9 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. pH'ı 9,3'e ayarlandı.

**Giemsa Çözeltisi:** 5 ml Tampon A, 5 ml Tampon B, 5 ml Giemsa boyası ve 85 ml distile su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı. Bu çözelti preparatların boyanmasında kullanıldı.

**May-Grunwald Çözeltisi:** Preparatların boyanmasında kullanılan bu çözelti 50 ml May-Grunwald stok solüsyonu ile 50 ml sorensen tampon çözeltisi karıştırılarak toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

**Entellan:** Şeffaf preparat kapatma solüsyonudur. Preparatlar daimi hale getirilirken kullanıldı.

### 3.2.4. Kemik İliği Örneklerinde *In vivo* Mikronukleus Tespiti

1. Her gruptaki deneklerden kemik iliği numunesi alındıktan sonra 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
2. Süre sonunda süpernatant atıldı.
3. Geride kalan kısma bir miktar fetal calf serum ilave edilerek süspansiyon edildi.
4. Daha sonra temiz lam üzerine 1 damla süspansiyon edilen solüsyon damlatıldı ve başka bir lamla 45°'lik açı ile bu damlanın yayılması sağlandı.
5. Preparatlar 1 gece kurutulmaya bırakıldı.
6. Preparatlar kuruduktan sonra saf metanolde 10 dk fikse edildi.
7. Daha sonra boyama işlemine geçildi.
8. Preparatlar önce stok May-Grunwald solüsyonunda 3 dk bekletildi.
9. Sonra 1:1 oranında hazırlanmış olan May-Grunwald+Sorensen fosfat tamponunda 5 dk bekletildi.
10. Son olarak sorensen fosfat tamponunda hazırlanmış % 5'lik Giemsa boyası ile 10-15 dk boyanmıştır.
11. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile sudan geçirilmiştir.
12. Boyanan preparatlar 1 gece kuruduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi.
13. Entellan ile kapatmadan 1-2 gün sonra ışık mikroskopunda 1000'lik büyütmede, her preparat üzerinde rastgele 1000 polikromatik hücre sayılarak, bu hücreler içerisindeki mikronukleus taşıyanlar tespit edildi ve yüzdeleri çıkarıldı. Ayrıca her preparatta 1000 hücredeki polikromatik ve normokromatik hücreler sayılarak oranlaması yapıldı.

### 3.2.5. RNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

**DEPC (Diethyl Pirokarbonat)'li Su:** RNA örneklerini ribonükleazlardan korumak için izolasyon yapılan ortamın ve kullanılan pipetlerin temizlenmesi için DEPC'li su kullanıldı. 0,1 ml DEPC 100 ml suya eklendi ve alt üst edildi. 37°C'de 12 saat bekletildi ve daha sonra 15 dk otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

**Etanol (% 75):** % 100'lük etanolden 75 ml alınıp üzeri DEPC'li su ile 100 ml'ye tamamlandı ve özel bir çekmeceye kaldırıldı.

#### 3.2.5.1. RNA İzolasyonu

RNAlater<sup>®</sup> solüsyonu içerisinde dondurularak -20°C'de saklanan karaciğer dokuları oda sıcaklığına getirildikten sonra homojenizasyon için dokuların üzerine 1 ml Trizol solüsyonu eklenerek Ultra Turrax homojenizatör cihazı ile 1 dk homojenize edildi ve RNA izolasyonu yapıldı. Trizol solüsyonu ile RNA izolasyonu aşamaları şu şekildedir:

1. Trizol içerisinde homojenize edilen dokular nükleoprotein kompleksinin ayrılması için 5 dk oda ısısında bekletildi.
2. 1 ml Trizol için 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda ısısında bekletildi.
3. 12.000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropil alkol içeren yeni bir tüpe alındı.
5. Tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda ısısında bekletildi.
6. 12.000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası pelletin üzerindeki süpernatant dikkatli bir şekilde atıldı ve pelletin üzerine 1 ml % 75 etanol eklendi.
8. RNA'nın degrades olmasını ve kırılmasını önlemek için 7500 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası % 75 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak 5-10 dk kurumaya bırakıldı.



10. Pellet miktarına bağılı olarak 20-50 µl Rnase free su eklendi.
11. Tüpler RNA'nın çözünmesi için 10 dk sıcak su banyosunda 55-60°C'de inkübe edildi.
12. İzole edilen RNA'lar analiz edilene kadar -20°C'de, analiz sonrası -80°C'de saklandı.

### 3.2.5.2. RNA'ların Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazında spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçülerek hesaplandı. OD-260/OD-280 oranı 1,7 ve üzeri olanlar çalışmada kullanıldı.

### 3.2.5.3. cDNA Sentezi

Konsantrasyonlarına göre toplam 5 µg olacak şekilde ayarlanan RNA örneklerine RNaz içermeyen su eklenerek (DEPC'li su) 9 µl'ye tamamlanmıştır. cDNA sentezi için 2 µl dNTP mix ve 1 µl oligo (dT)20 primeri eklenerek Stratagene MX3005p Real Time PCR cihazında 65°C'de 5 dk denatüre edildikten sonra hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk bekletildi. ThermoScript™ Revers transkriptaz enzimi (İnvitrogen) ile 8µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı ve RNA üzerine eklendi. Daha sonra termal cyclers cihazında 55°C'de 45 dk inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon reaksiyonunu sonlandırmak için 85°C'de 5 dk bekletildi ve son olarak 1 µl RNase H enzimi eklenerek 20 dk bekletildi ve 20 µl olarak sentez edilen cDNA örneklerinde real-time PCR ile duyarlılık kaybı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

	<b>Miktarı</b>
<b>5X cDNA sentez tamponu</b>	4 µl
<b>0,1 M DTT</b>	1 µl
<b>RNazOUT (RNaz İnhibitörü)</b>	1 µl
<b>DEPC'li su</b>	1 µl
<b>ThermoScript RT enzimi</b>	1 µl
<b>Toplam:</b>	8 µl

#### 3.2.5.4. Real Time QRT- PCR Çalışmaları

Fare karaciğer dokularında indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan Gadd45 ve Gadd153 genlerinin ekspresyonu Stratagene MX3005p Real Time PCR cihazında gerçekleştirildi. RT-PCR deneylerinde, primerler özgül olmayan ürünlerin bağlanmasını engelleyecek şekilde seçildi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup Gadd45 (Kaufmann *et al.* 2011) ve Gadd153 (Moriya *et al.* 2011) baz dizilerinin sentezi yaptırıldı (Çizelge 3.1). Housekeeping gen (kontrol gen) olarak GAPDH (Moriya *et al.* 2011) kullanıldı. MX3005p RT-PCR cihazında, erime eğrisi analizi yapılarak primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin olup olmadığı da kontrol edilmiştir.

Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{kontrol\ grubu}$$

formülü uygulanarak hesaplanan değer, her bir gen için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi, misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak GAPDH (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

<b>RT-PCR Karışımı:</b>	<b>Miktarı</b>
<b>SYBR Green karışımı</b>	10 µl
<b>Forward primer (10 pmol/µl)</b>	1 µl
<b>Reverse primer (10 pmol/µl)</b>	1 µl
<b>Distile su</b>	7 µl
<b>cDNA</b>	1 µl
<b>Toplam:</b>	20 µl

RT-PCR reaksiyonu Stratagene MX3005p Real Time PCR cihazında, aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

95°C'de 10 dk

94°C'de 1 dk

X°C'de 1 dk

72°C'de 1 dk

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları

<b>Gen</b>	<b>No*</b>		<b>Oligonükleotid Dizisi</b>	<b>E<sup>+</sup></b>	<b>Tm</b>	<b>bç</b>
<b>Gadd45</b>	NM_007836.1	<b>F</b>	GCTGCCAAGCTGCTCAA	2	57,6	71
		<b>R</b>	TGCTGACGAAGACGA	3	56,2	
<b>Gadd153</b>	NM_007837.3	<b>F</b>	AATAACAGCCGGAACCTGAGGA	1	58,2	200
		<b>R</b>	CCCAATTTCATCTGAGGACAGGA	3	56,6	
<b>GAPDH</b>	NM_008084.2	<b>F</b>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	1	58,1	150
		<b>R</b>	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG		57,8	

\*NCBI Gene veritabanı erişim numaraları, E<sup>+</sup>: Primerin yer aldığı ekzon

### 3.2.6. Plazmada TAK ile TOK'un Hesaplanması

Farelerin kuyruk veninden alınan kanlardan ayrılan plazma örneklerinde OSI değerinin belirlenmesi için TAK değerleri Total Antioxidant Status (TAS) Kiti (Rel Assay Diagnostics), TOK değerleri ise Total Oxidant Status (TOS) Kiti (Rel Assay Diagnostics) ile ELISA cihazı tarafından spektrofotometrik olarak belirlendi.

Daha sonra, OSI değeri TOK seviyesinin, TAK seviyesine oranının yüzdesi olarak kabul edildi. Hesaplama için TAK'ın ünite sonuçları mmol/L'ye değiştirildi. OSI kit (Rel Assay Diagnostics) katoloğunda belirtilen aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$OSI = [(TOK, \mu\text{mol/L}) / (TAK, (\text{mmolTroloxEquiv/L}) \times 100)]$$

### 3.2.7. İstatistiksel Analizler

Veri analizleri PASW Statistics 18.0 paket programı yardımı ile yapılmıştır. Her bir parametre için gruplar arası farkların belirlenmesinde Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Levene testi ile varyansların homojenitesi belirlenmiştir. Fark belirlenen gruplarda farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığının belirlenmesi adına; homojen varyansa sahip parametreler için post hoc Tukey Testi, homojen varyansa sahip olmayanlarda ise post hoc Tamhane testi kullanılmıştır. Ayrıca DNA hasar derecesinin zamana bağlı değişiminin anlamlı düzeyde olup olmadığının belirlenmesinde eşleştirilmiş örneklem T testi kullanılmıştır. Önemlilik düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir. Tablolarda gösterimler Ort $\pm$ SH şeklinde yapılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, deneysel olarak alkilleyici ajanlardan MMS ve SP'e maruz bırakılmış farelerde DNA hasarı, total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) ile genotoksisite belirteci mikronukleus indeksi ve hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd45 ve Gadd153'ün ifadelerindeki değişiklikler ile bunlara curcumin'in etkileri belirlendi.

### 4.1. Curcumin'in 24. ve 48. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri

#### 4.1.1. Curcumin'in 24. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri

Çalışmamızda, 24. saatte kontrol (10,67±1,12) , curcumin (9,67±0,80) ve DMSO (12,33±0,95) gruplarındaki DNA hasar dereceleri pozitif kontrol grupları olan MMS (73,00±10,54) ve SP (84,33±15,57) gruplarına göre düşüktür ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.1).

24. saatte önce curcumin, sonra MMS ve SP uygulanmış 4. (15,67±1,23) ve 5. (42,67±6,61) gruplardaki DNA hasar derecesinin, sadece curcumin uygulanmış 2. gruba (9,67±0,80) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcuminin MMS ve SP'e karşı koruyucu özellik gösterdiği bulundu. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış 6. gruptaki (71,83±6,74) DNA hasar derecesinin, sadece MMS uygulanmış 8. gruba (73,00±10,54) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcuminin, MMS'in oluşturduğu hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu. Önce SP, sonra curcumin uygulanmış 7. grupta (75,33±6,34) DNA hasar derecesinin, sadece SP uygulanmış 9. gruba (84,33±15,57) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcuminin, SP'nin oluşturduğu hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu. (Çizelge 4.1). Curcumin'in 24. ve 48. saatte mononükleer lökoitlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına ait jel görüntüleri resim 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Curcuminin 24. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına etkileri

<b>Uygulama grupları</b>	<b>N</b>	<b>DNA Hasar Skoru (AU) Ort±SH</b>
<b>1)Kontrol</b>	6	10,67±1,12a
<b>2)Curcumin</b>	6	9,67±0,80a
<b>3)DMSO</b>	6	12,33±0,95a
<b>4)Curcumin+MMS</b>	6	15,67±1,23a
<b>5)Curcumin+SP</b>	6	42,67±6,61a
<b>6)MMS+Curcumin</b>	6	71,83±6,74bc
<b>7)SP+Curcumin</b>	6	75,33±6,34bc
<b>8)MMS</b>	6	73,00±10,54bc
<b>9)SP</b>	6	84,33±15,57c

\* Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli (Tukey çoklu karşılaştırma testi)  
Ort; Ortalama, SEM; Standart Hata, AU; Arbitrary Unit  
MMS; Metil metansülfonat, SP; Siklofosfamid, DMSO; Dimetilsülfoksit

#### **4.1.2. Curcumin'in 48. Saatte Mononükleer Lökositlerde MMS ve SP ile Uyarılan DNA Hasarına Etkileri**

Çalışmamızda, 48.saatte de kontrol (6,67±0,61), curcumin (9,33±1,26) ve DMSO (10,33±1,89) gruplarındaki DNA hasar derecelerinin pozitif kontrol grupları olan MMS (38,33±5,6) ve SP (64,67±19,67) gruplarına göre düşüktür ( $p \geq 0,05$ ). (Çizelge 4.2.).

48. saatte önce curcumin, sonra MMS ve SP uygulanmış 4. (32,33±6,25) ve 5. (18,17±2,63) gruplardaki DNA hasar derecesinin, sadece curcumin uygulanmış 2. gruba (9,33±1,26) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin2in MMS ve SP'e karşı koruyucu özellik gösterdiği bulundu. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış 6. gruptaki (30,00±2,38) DNA hasar derecesinin, sadece MMS uygulanmış 8. gruba (38,33±5,6) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin'in MMS'in oluşturduğu hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu.

Önce SP, sonra curcumin uygulanmış 7. gruptaki ( $69,67 \pm 6,64$ ) DNA hasar derecesinin, sadece SP uygulanmış 9. gruba ( $64,67 \pm 19,67$ ) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin'in SP'nin oluşturduğu hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu (Çizelge 4.2).

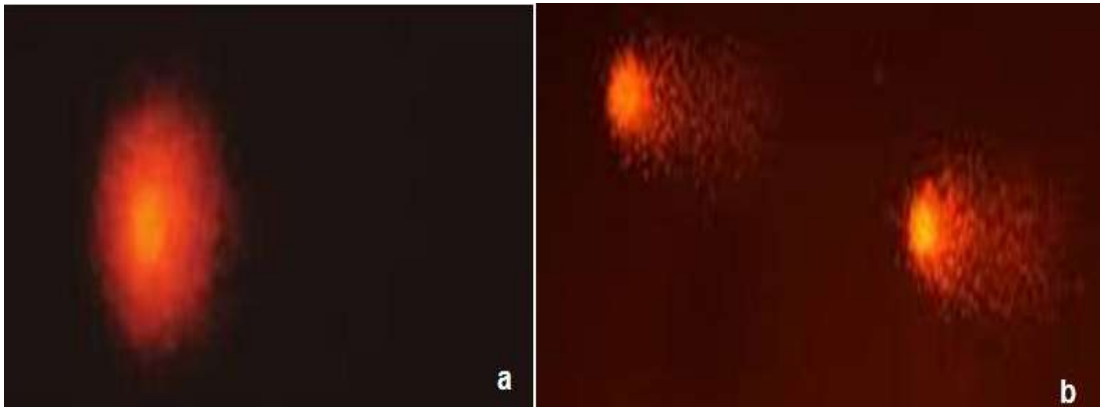
**Çizelge 4.2.** Curcuminin 48. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına etkileri

Uygulama grupları	N	DNA Hasar Skoru (AU) Ort $\pm$ SH
1)Kontrol	6	6,67 $\pm$ 0,61a
2)Curcumin	6	9,33 $\pm$ 1,26a
3)DMSO	6	10,33 $\pm$ 1,89a
4)Curcumin+MMS	6	32,33 $\pm$ 6,25ab
5)Curcumin+SP	6	18,17 $\pm$ 2,63a
6)MMS+Curcumin	6	30,00 $\pm$ 2,38ab
7)SP+Curcumin	6	69,67 $\pm$ 6,64c
8)MMS	6	38,33 $\pm$ 5,6abc
9)SP	6	64,67 $\pm$ 19,67bc

\* Sütunlardaki farklı harfler  $p < 0,05$  düzeyinde önemli (Tukey çoklu karşılaştırma testi)

Ort; Ortalama, SEM; Standart Hata, AU; Arbitrary Unit

MMS; Metil metansülfonat, SP; Siklofosamid, DMSO; Dimetilsülfoksit



**Resim 4.1.** Curcumin'in 24. ve 48. saatte mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına ait comet assay görüntüleri

a Kontrol, curcumin ve DMSO gruplarına ait Comet görüntüleri

b MMS ve SP ile uyarılan Comet görüntüleri

## 4.2. Curcumin'in Fare Kemik İliği Hücrelerinde MMS ve SP ile Uyarılan Genotoksisite Üzerine Etkileri

Fare kemik iliği hücrelerinin MMS ve SP ile uyarılması sonucu farelerde, genotoksisiteyi belirlemede kriter olarak kullanılan total MN'lu PCE yüzdesi ve PCE/NCE oranı verilmiştir (Çizelge 4.3).

Fare kemik iliği hücrelerinde, kontrol ( $4,17\pm 0,60$ ), curcumin ( $4,33\pm 0,67$ ) ve DMSO ( $3,50\pm 0,43$ ) gruplarındaki MN'lu PCE değerleri pozitif kontrol grupları olan MMS ( $14,33\pm 0,72$ ) ve SP ( $16,33\pm 0,62$ ) gruplarına göre düşüktür ( $p<0,05$ ).

Önce curcumin, sonra MMS uygulanmış 4. grubun ( $10,00\pm 0,58$ ), sadece MMS'in uygulandığı 8. gruba ( $14,33\pm 0,72$ ) göre MN PCE oluşumunu azaltmada istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve curcumin'in MMS'a karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu. Önce curcumin, sonra SP uygulanmış 5. grubun ( $10,50\pm 0,67$ ), sadece SP uygulanmış 9.gruba ( $16,33\pm 0,62$ ) göre MN PCE oluşumunu azaltmada istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve curcumin'in SP'e karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış 6. grubun ( $10,17\pm 0,60$ ), sadece MMS uygulanmış 8. gruba ( $14,33\pm 0,72$ ) göre MN PCE oluşumunu azaltmada istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin'in, MMS'ın oluşturduğu MN PCE oluşumunu tamir etmede yetersiz kaldığını gösterdi. Önce SP, sonra curcumin uygulanmış 7. grubun ( $12,83\pm 0,48$ ), sadece SP uygulanmış 9.gruba ( $16,33\pm 0,62$ )göre MN PCE oluşumunu azaltmada istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in, SP'in oluşturduğu MN PCE oluşumunu tamir etme özelliğine sahip olduğunu gösterdi.

Ayrıca MMS ile SP'nin fare kemik iliği hücrelerinde toksik etki gösterip göstermediğini anlamak için, PCE ile NCE arasındaki oran da değerlendirildi (Çizelge 4.3). MMS ( $1,08\pm 0,03$ ) ve SP ( $0,98\pm 0,03$ ) uygulanmış farelerde, PCE/NCE oranının kontrol ( $1,80\pm 0,04$ ), curcumin ( $1,72\pm 0,02$ ) ve DMSO ( $1,75\pm 0,02$ ) gruplarına göre az olduğu ve dolayısıyla MMS ile SP'nin toksik etki gösterdiği bulundu.



Önce curcumin, sonra MMS uygulanan 4. grubun (1,25±0,01), sadece MMS uygulanmış 8. gruba (1,08±0,03) göre PCE/NCE oranı açısından istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in MMS'a karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu. Önce curcumin, sonra SP uygulanan 5. grubun (1,39±0,02), sadece SP uygulanmış 9. gruba (0,98±0,03) göre istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in SP'a karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu.

Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış 6. grubun (1,18±0,03), sadece MMS uygulanmış 8. gruba (1,08±0,03) göre PCE/NCE oranı açısından istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin'in, MMS'in oluşturduğu toksik etkiyi tamir etmede yetersiz olduğu bulundu. Önce SP, sonra curcumin uygulanmış 7. grubun (1,06±0,06), sadece SP uygulanmış 9. gruba (0,98±0,03) göre MN PCE oluşumunu azaltmada istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in, SP'in oluşturduğu toksik etkiyi tamir etme özelliğine sahip olduğu bulundu. Resim 4.2'de fare kemik iliği hücrelerinin MMS ve SP ile uyarılması sonucu gözlenen PCE, NCE ve MN PCE görüntüleri gösterilmektedir.

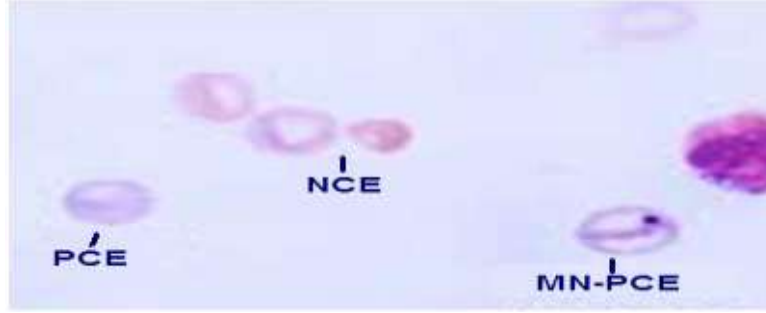
**Çizelge 4.3.** MMS ve SP ile uyarılan fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen total MN PCE değerleri ile PCE/NCE oranı

Uygulama grupları	MN PCE değerleri (%) Ort±SH	PCE/NCE oranı Ort±SH
1) Kontrol	4,17±0,60a	1,80±0,04a
2) Curcumin	4,33±0,67a	1,72±0,02a
3) DMSO	3,50±0,43a	1,75±0,02a
4) Curcumin+MMS	10,00±0,58b	1,25±0,01ab
5) Curcumin+SP	10,50±0,67bc	1,39±0,02ab
6) MMS+Curcumin	10,17±0,60bc	1,18±0,03bc
7) SP+Curcumin	12,83±0,48c	1,06±0,06b
8) MMS	14,33±0,72cd	1,08±0,03bc
9) SP	16,33±0,62de	0,98±0,03c

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli (Tukey çoklu karşılaştırma testi)

MN PCE; Mikronukleuslu Polikromatik Eritrosit, Ort; Ortalama, SH; Standart Hata

MMS; Metil metansülfonat, SP; Siklofosfamid, DMSO; Dimetilsülfoksit



**Resim 4.2.** MMS ve SP ile uyarılan fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen PCE, NCE ve MN PCE görüntüleri

### 4.3. Curcumin'in MMS ve SP ile Uyarılan Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Farelerde, curcumin'in MMS ve SP ile uyarılan genotoksisitede, oksidatif stres indeksi (OSİ), total antioksidan kapasitenin (TAK) total oksidan kapasiteye (TOK) bölünmesi ile hesaplandı. OSİ düzeyleri, kontrol ( $9,88 \pm 0,26$ ), curcumin ( $8,55 \pm 0,24$ ) ve DMSO ( $9,40 \pm 0,18$ ) gruplarında, pozitif kontrol grupları olan MMS ( $22,17 \pm 1,09$ ) ve SP ( $25,45 \pm 0,80$ ) uygulanmış 8. ve 9. gruplara göre istatistiksel açıdan düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). (Çizelge 4.4.).

Önce curcumin, sonra MMS uygulanan 4. grubun ( $10,58 \pm 0,63$ ), sadece MMS uygulanmış olan 8. gruba ( $22,17 \pm 1,09$ ) göre OSİ düzeyinin istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in, MMS'a karşı koruyucu özellik gösterdiği bulundu. Önce curcumin, sonra SP uygulanan 5. grubun ( $9,18 \pm 0,52$ ), sadece SP uygulanmış 9. gruba ( $25,45 \pm 0,80$ ) göre OSİ düzeyinin istatistiksel olarak farklı olduğu ve curcumin'in SP'a karşı koruyucu özellik gösterdiği bulundu. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış 6. gruptaki ( $21,50 \pm 1,23$ ) OSİ düzeyinin, sadece MMS uygulanmış 8. gruba ( $22,17 \pm 1,09$ ) göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ve curcumin'in, MMS'ın oluşturduğu oksidatif hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu. Önce SP, sonra curcumin uygulanmış 7. gruptaki ( $19,55 \pm 1,31$ ) OSİ düzeyinin, sadece SP uygulanmış 9. gruba ( $25,45 \pm 0,80$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve curcumin'in, SP'in oluşturduğu oksidatif hasarı tamir etme özelliğine sahip olduğu bulundu.

**Çizelge 4.4.** Curcumin'in MMS ve SP ile uyarılan oksidatif stres üzerine etkisi

Uygulama grupları	OSI düzeyi (%) Ort±SH
1)Kontrol	9,88±0,26a
2)Curcumin	8,55±0,24a
3)DMSO	9,40±0,18a
4)Curcumin+MMS	10,58±0,63a
5)Curcumin+SP	9,18±0,52a
6)MMS+Curcumin	21,50±1,23b
7)SP+Curcumin	19,55±1,31b
8)MMS	22,17±1,09bc
9)SP	25,45±0,80c

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli (Tukey çoklu karşılaştırma testi)

OSI; Oksidatif Stres İndeksi, Ort; Ortalama, SH; Standart Hata

MMS; Metil metansülfonat, SP; Siklofosfamid, DMSO; Dimetilsülfoksit

#### 4.4. Gadd Genlerine Ait Bulgular

Curcumin'in, alkilliyici ajanlardan MMS ve SP'in oluşturduğu hasara karşı etkisini belirlemek amacıyla, karaciğer dokusunda hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar genleri olan Gadd45 ve Gadd153'ün mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi.

RT-PCR'da 3 basamaklı amplifikasyon işleminden sonra, analizi yapılan genlerin (Gadd45 ve Gadd153) ve kontrol GAPDH geninin elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerleri belirlendi. mRNA ekspresyon düzeylerini hesaplamak için formülde kullanılan ortalama Ct değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Moleküler analizi yapılan genlerin Real-time Quantitative PCR (RT-QPCR) Ct sonuçları

	<b>Gadd45</b>	<b>Gadd153</b>	<b>GAPDH</b>
<b>Kontrol</b>	26,71	25,89	18,61
<b>Curcumin</b>	26,38	26,11	19,17
<b>MMS</b>	26,58	26,23	17,52
<b>SP</b>	28,08	29,36	20,37
<b>Curcumin+MMS</b>	26,70	26,67	17,87
<b>Curcumin+SP</b>	25,04	24,22	17,91
<b>MMS+Curcumin</b>	28,31	27,01	18,65
<b>SP+Curcumin</b>	27,30	26,50	17,87

MMS: metil metansülfonat, SP: siklofosamid, Gadd45: hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar geni 45, Gadd153: hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar geni 153, GAPDH: glukoz-6- fosfat dehidrogenaz

Analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile genlere ait Ct değerleri kullanılarak hesaplandı (Pfaffl, 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyleri, misli olarak azalma (-) ya da artış (+) şeklinde belirlendi. MMS ve SP gruplarına ait mRNA düzeyleri misli olarak artış veya azalış şeklinde hesaplanırken kontrol grubu baz alınmış olup, Curcumin+MMS ve Curcumin+SP gruplarına ait mRNA seviyelerindeki değişimler curcumin grubu ile, MMS+Curcumin grubu mRNA düzeyleri MMS grubu, SP+Curcumin grubu mRNA düzeyleri ise SP grubu ile kıyas yapılarak hesaplanmıştır. Misli olarak bulunan ve Çizelge 4.6'de verilen sonuçlarda eksi (-) değerler hedef genin baskılandığını, artı (+) değerler ise hedef genin uyarıldığını ifade etmektedir.

**Çizelge 4.6.** Moleküler analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyonlarına göre uyarılma (+) veya baskılanma (-) durumları

<b>mRNA ekspresyonlarındaki değişimler (misli olarak)</b>		
	<b>Gadd45</b>	<b>Gadd153</b>
<b>MMS<sup>a</sup></b>	+ 1,9	+ 2,6
<b>SP<sup>a</sup></b>	+ 1,3	+ 1,0
<b>Curcumin+MMS<sup>b</sup></b>	+ 3	+ 3,4
<b>Curcumin+SP<sup>b</sup></b>	+1,0	+ 1,5
<b>MMS+Curcumin<sup>c</sup></b>	+ 1,5	- 1,3
<b>SP+Curcumin<sup>d</sup></b>	+ 3,3	-1,3

mRNA ekspresyon düzeyleri, misli olarak azalma (-) ya da artış (+) şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak GAPDH (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. MMS: metil metansülfonat, SP: siklofosfamid, Gadd45: hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar geni 45, Gadd153: hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasar geni 153.

<sup>a</sup>: Kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

<sup>b</sup>: Curcumin grubu ile karşılaştırıldı.

<sup>c</sup>: MMS grubu ile karşılaştırıldı.

<sup>d</sup>: SP grubu ile karşılaştırıldı.

Çizelge 4.6’de verilen MMS ve SP gruplarına ait Gadd45 mRNA ekspresyon düzeylerindeki artış miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MMS grubunun 1,9 misli, SP grubunun ise 1,3 misli uyarıldığı görülmektedir. Önce curcumin, sonra MMS uygulanmış grup, curcumin grubuyla kıyaslandığında, farelerin mRNA ekspresyonlarının 3 misli uyarıldığı, önce SP, sonra curcumin uygulanan grupta ise mRNA düzeyinin 1 misli uyarıldığı belirlenmiştir. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış grup, MMS grubuyla karşılaştırıldığında, bu grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 1,5 misli uyarıldığı görülmektedir. Önce SP, sonra curcumin uygulanan grup, SP grubuyla kıyaslandığında, bu grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 3,3 misli uyarıldığı gösterilmiştir.

MMS ve SP gruplarına ait Gadd153 mRNA ekspresyon düzeylerindeki artış miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MMS grubunun 2,6 misli, SP grubunun ise 1 misli uyarıldığı görülmektedir. Önce curcumin, sonra MMS uygulanmış grup, curcumin grubuyla kıyaslandığında, farelerin mRNA ekspresyonlarının 3,4 misli uyarıldığı, önce SP, sonra curcumin uygulanan grupta ise mRNA düzeyinin 1,5 misli uyarıldığı belirlenmiştir. Önce MMS, sonra curcumin uygulanmış grup, MMS grubuyla karşılaştırıldığında, bu grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 1,3 misli baskılandığı görülmektedir. Önce SP, sonra curcumin uygulanan grup, SP grubuyla kıyaslandığında, bu grubun mRNA ekspresyon düzeylerinin 1,3 misli baskılandığı gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, doğrudan etkili alkilleyici ajanlardan olan MMS ve dolaylı yoldan etkili ajan olan SP verilmiş farelerde, mononükleer lökositlerde DNA hasarı, plazmada TAK, TOK ile kemik iliği hücrelerinde genotoksisite belirteci mikronukleus indeksi ve karaciğer dokusunda hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd45 ve Gadd153'ün ifadelerindeki değişiklikler ile bunlara curcumin'in etkileri çalışıldı.

Ekzojen etkenlerden olan alkilleyici ajanlar, DNA ve RNA gibi organik makromoleküllere, proteinlerin amino grup, karboksil, sülfüdril, fosfat grupları yerine alkil gruplarını transfer ederek hücre fonksiyonlarının bozulmasına yol açan ajanlardır (Klug ve Cummings 2003). Guaninin N 7 pozisyonu en sık alkillenen bölgedir ve alkillenme sonucunda mRNA yanlış kodlanması sonucunda DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır (Arlett *et al.* 2006). Alkilleyici ajanlardan olan MMS; DNA ve aminoasitlerin özellikle nitrojen atomlarının nükleofilik bölgelerini metilleme özelliğinde olan, zayıf mutajenik ve karsinojenik etki gösteren bir moleküldür (Franke *et al.* 2005, Horvathova *et al.* 1998). MMS'in genotoksik etkisi, baz modifikasyonlarına bağlıdır. MMS'in bazlarla reaksiyona girmesi sonucunda bazların N-glikozidik bağları zayıflar ve DNA zincirinde depürinasyon/depirimidinasyona yol açarak abazik bölgelerin (AP bölgeleri) oluşumuna neden olur (Loeb *et al.* 1986). MMS, yapısında reaktif grup olarak sülfür içeren, doğrudan etkili monofonksiyonel bir ajandır ve tek reaktif grubuna sahip olduğu için DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yaparak DNA'da hasar oluşturur (Vrzoc and Petras 1997). Kanser tedavisinde çok kullanılan ve bağışıklık sistemini baskılayıcı bir ilaç olan SP ise bifonksiyonel alkilleyici ajandır. 2 tane reaktif grup taşır ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girer (Şekil 2.2) (Ayhancı 1997, Franke *et al.* 2005). SP'nin genotoksik etkisi aktif olan metabolitleri aracılığı ile olur, çünkü normalde SP inaktif formdadır. Aktif metabolitlerden olan FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, dolayısıyla SP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir (Ayhancı 1997, Hengstler *et al.* 1997).

SP'nin toksik etki göstermesinde etkili olan metaboliti akrolein'dir. Akrolein, dokularda antioksidan savunma mekanizmasına müdahale ederek yüksek oranda serbest radikal oluşumuna sebep olur ve oluşan serbest radikaller, enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle etkileşime girerek onların fonksiyonlarının bozulmasına yol açar (Senthilkumar *et al.* 2006).

Curcumin'in 24. ve 48. saatlerde mononükleer lökositlerde MMS ve SP ile uyarılan DNA hasarına etkileri Comet assay ile belirlendi. Hem 24. hem de 48. saatte MMS ve SP'in yüksek seviyede hasar oluşturduğu, fakat SP'in MMS'a göre daha yüksek seviyede hasar oluşturduğu bulundu. MMS ve SP ile uyarılan genotoksisite üzerine portakal suyunun etkileri ile yapılan bir çalışmada ise, mononükleer lökositlerde MMS'in hem 24. saatte hem de 48. saatte SP'ye göre daha yüksek seviyede hasar oluşturduğu gösterilmiştir (Franke *et al.* 2005). Franke ve ark.'nın C vitamininin tamir etme özelliği ile ilgili yaptıkları başka bir çalışmada da mononükleer lökositlerde, MMS'in SP'ye göre daha yüksek seviyede hasar oluşturduğu gösterilmiştir (Franke *et al.* 2005). Çalışmamızda, SP'in MMS'a göre daha yüksek seviyede DNA hasarı oluşturması, MMS'in tek reaktif grup, SP'in ise iki tane reaktif grup taşıması ve DNA ile etkileştikleri nükleofilik bölgelerin farklı olmasından veya SP'in toksik etkiye sebep olan metabolitlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Önce curcumin, sonra MMS ve SP uygulanmış olan gruplarda, curcumin'in MMS ve SP'in oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu. Portakal suyu ile yapılan çalışmada, portakal suyunun önce, MMS ve SP'in sonra uygulandığı gruplarda, portakal suyunun MMS ve SP'e karşı koruyucu özellik gösterdiği bulunmuştur (Franke *et al.* 2005). C vitamininin farklı dozları (1mg/kg ve 30 mg/kg) ile yapılan çalışmada ise, C vitamininin farklı dozlarının (1mg/kg ve 30 mg/kg) önce, MMS ve SP'in sonra uygulandığı gruplarda, C vitamininin MMS ve SP'e karşı koruyucu özellik gösterdiği bulunmuştur (Franke *et al.* 2005). Ayrıca Swiss farelerde, inorganik arsenik çeşitlerinden biri olan sodyum arsenit (As III) ile yapılan başka bir çalışmada ise, curcumin'in farklı dozlarda (5, 10 ve 15 mg/kg) uygulanması sonucunda da, curcumin'in mononükleer lökositlerde DNA hasar derecesini azaltarak koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Biswas *et al.* 2010).



Başka bir çalışmada ise, metal iyonlarından olan bakır ile farelerde genotoksisite oluşturulduğunda, curcumin'in DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir (Corona *et al.* 2007). Curcumin yapısında benzen halkaları üzerinde fenolik ve metoksi grupları ile  $\beta$  pozisyonunda bağlanmış 2 keton grubu içermektedir. Curcumin'in  $\beta$  pozisyonunda bağlanmış 2 keton grubu içermesi antioksidan özellik göstermesinde rol oynamaktadır (Sreejayan and Rao 1996).

Çalışmamızda önce MMS ve SP, sonra curcumin uygulanan gruplarda ise, curcumin'in, MMS ve SP'nin oluşturduğu hasarı tamir etmede yetersiz kaldığı bulundu. Portakal suyu ve C vitamininin farklı dozları ile yapılan çalışmalarda ise, portakal suyu ve C vitamininin MMS ve SP'nin oluşturduğu hasarı tamir etme özelliğinin olduğu gösterilmiştir (Franke *et al.* 2005). Franke ve ark.'nın (2005) yaptıkları çalışmalarda, portakal suyu ve C vitamininin fenolik bileşikler olmasından dolayı, MMS ile SP'in oluşturdukları hasarı tamir etme yeteneğini arttırdığını belirtmişlerdir (Franke *et al.* 2005).

Çalışmamızda, curcumin'in oksidatif stres (hasar) üzerine de olumlu etkileri bulundu. Önce curcumin, sonra MMS ve SP uygulanmış gruplarda, curcumin'in oksidatif stresi azalttığı bulundu. Farelerde yapılan başka bir çalışmada, inorganik arsenik çeşitlerinden biri olan sodyum arsenit (As III) ile uyarılan oksidatif stresi, curcumin'in azalttığı gösterilmiştir (Biswas *et al.* 2010). Farelerde streptozosinle oluşturulmuş diyabette, curcumin'in serbest oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı bilinmektedir (Sajithlal *et al.* 1998, Majithiya *et al.* 2005). Curcumin'in oksidatif strese karşı koruyucu özellik göstermesi hem fenolik bileşik olması hem de elektron donörü gibi hareket ederek serbest radikalleri süpürücü özellik göstermekte ve buna bağlı olarak antioksidan savunmayı arttırmaktan kaynaklanmaktadır. Ayrıca curcumin'in, serbest radikal oluşumuna sebep olan lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinden dolayı da antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir (Reddy and Lokesh 1994, Sreejayan and Rao 1994).

Sonuç olarak oksidatif strese bağlı olarak oluşan birçok hastalığın tedavisinde curcumin'in koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir ve bu koruyucu etkisinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir.

Daha önceden yapılmış olan epidemiyolojik, klinik ve hayvan çalışmaları ile de curcumin'in; antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileştirici, antimitojenik, antikarsinojenik, antimetastatik, nöro koruyucu, angiogenezi düzenleyici gibi birçok olumlu özelliğe sahip olduğu ve dolaşımında toksik özellik göstermeyen doğal bir madde olduğu gösterilmiştir (Priyadarsini 1997, Limtrakul *et al.* 1997, Pandya *et al.* 2000, Hatcher *et al.* 2008).

Kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin anlaşılmasındaki en önemli kriterlerden biri de MN oluşturabilme yeteneğidir. *In vivo* MN testi ile genellikle, kemik iliği ve/veya periferel kan hücrelerindeki PCE ile NCE'lerdeki MN oluşumunun analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı belirlenmektedir (Şekeroğlu 2011). PCE; tam olarak gelişmemiş, olgunlaşmamış, gelişimin ara safhasında ve ribozomları olan eritrosittir. NCE ise, olgun, ribozom içermeyen ve periferel döngüde yaklaşık 1 ay kalabilen eritrosittir (Mavournin *et al.* 1990). Hematopoietik doku olan kemik iliği hücrelerinin çoğalması sırasında çeşitli kimyasal maddelerin uygulanması, kromozom hasarına veya mitoz bölünmenin engellenmesine yol açmaktadır. Eritropoezis sırasında son mitoz bölünmeden sonra, kemik iliğindeki eritroblastlar PCE'lere dönüşürken çekirdeklerini kaybederler ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplazmada MN oluşumuna neden olur. Uygulanan kimyasal ajanın toksik etki gösterip göstermediği, PCE ile NCE arasındaki orana göre değerlendirilmektedir. Kimyasal ajan uygulanan hayvanlarda, PCE/NCE oranının kontrol grubuna göre önemli derecede azalması, uygulanan kimyasal ajanın kemik iliği hücrelerine ulaştığını, nükleuslu hücrelerin bölünmesini ve olgunlaşmasını engelleyerek eritrosit oluşumunu azalttığının ve dolayısıyla toksik etki oluşturduğunun göstergesidir (Cicchetti *et al.* 1999, Yener ve Dikmenli 2009).

Çalışmamızda, fare kemik iliği hücrelerinin MMS ve SP ile uyarılması sonucu, mononükleer lökositlerdeki DNA hasarına benzer şekilde, SP'in MMS'a göre daha fazla MN PCE oluşturduğu bulundu. SP ile uyarılan genotoksisite üzerine safran, sarımsak ve curcumin'in birlikte etkilerinin bakıldığı bir çalışmada da SP'nin yüksek oranda MN PCE oluşturduğu ifade edilmiştir (Premkumar *et al.* 2004). Çalışmada, curcumin'in, MMS ve SP den önce uygulandığı gruplarda MN PCE oluşumunu azaltarak koruyucu özellik gösterdiği bulundu.

Fakat curcumin'in MMS ve SP'den sonra uygulandığı gruplarda ise curcumin'in sadece SP'in oluşturduğu MN PCE oluşumunu azaltarak tamir etme özelliğinin olduğu bulundu. Premkumar ve ark. (2004)'nin yaptığı çalışmada da SP'den önce safran bitkisinin verildiği grupların, sarımsak ve curcumin verilen gruplara oranla daha az koruyucu özellik gösterdiği, fakat üç bitkisel ajanın birlikte verildiği grupta önemli ölçüde MN PCE oluşumunda azalış olduğu gösterildi.

Başka bir çalışmada ise farelerde, metal iyonlarından olan bakırın 390 ppm dozunda verildiği grupta, bakırın kontrole göre yüksek oranda MN PCE oluşturduğu ve curcumin'in de bu oranı azalttığı gösterilmiştir (Corona *et al.* 2007). Ayrıca Swiss farelerde, inorganik arsenik çeşitlerinden biri olan sodyum arsenit (As III) ile yapılan başka bir çalışmada ise, curcumin'in farklı dozlarda (5, 10 ve 15 mg/kg) uygulanması sonucunda da, curcumin'in MN PCE oluşumunu azaltarak koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Biswas *et al.* 2010).

Ayrıca MMS ile SP'in fare kemik iliği hücrelerinde toksik etki gösterip göstermediğini anlamak için, PCE ile NCE arasındaki oran da değerlendirildi. MMS ve SP uygulanmış gruplarda, PCE/NCE oranının kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı, uygulanan MMS ve SP'in fare kemik iliği hücrelerine ulaşarak, nükleuslu hücrelerin bölünmesini ve olgunlaşmasını engelleyerek eritrosit oluşumunu azalttığını ve dolayısıyla toksik etki oluşturduğu bulundu. MMS ve SP ile uyarılmış genotoksisite de, curcumin'in MMS ve SP'a göre hem MN PCE oluşumunu azaltması hem PCE/NCE oranının kontrol grupları ile benzer olmasından dolayı, curcumin'in antijenotoksik özellik gösterdiği bulundu. Curcumin'in, MMS ve SP' karşı antijenotoksik özellik göstermesi, fenolik bileşik olmasına veya toksik bileşikleri uzaklaştırmada rol oynayan faz I ve faz II reaksiyonlarında rol oynayan enzimlerin çalışmasını baskılamasından kaynaklanabilir.

Hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd45 ve Gadd153 genleri ilk defa UV radyasyon ve doğrudan etkili alkilleyici ajan olan MMS'a maruz kalmış Çin hamsterların yumurtalık hücrelerinden izole edilmiştir.

Daha sonraları ise, ROS'nin oluşturduğu stres, ER stresi, besin azlığı, kemoterapötik ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren ajanlarla da uyarıldığı gösterilmiştir (Fornace *et al.* 1988, Fornace 1992, Zinszner *et al.* 1998). Stres faktörü, bu proteinlerin uyarılmasına ve çekirdekte birikmesine yol açmaktadır (Ron and Habener 1992). Daha sonraları, DNA'ya zarar veren nükleozid analoglarının veya UV ışığının tek başına DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd153'ü indükleyemediği belirtilmiştir (Wang *et al.* 1996). Glukoz yokluğunun, ER'da N-bağlı protein glikozilasyonu aracılığıyla ER stresine yol açtığı bilinmektedir. Bu genin diğer indükleyicileri; tunikamisin, tapsigargin ve ditiotreitol 'dur. Bunlardan tunikamisin protein glikozilasyonunu inhibe etmektedir. Tapsigargin, ER kalsiyum stoklarının boşalmasıyla ER stresine sebep olurken, ditiotreitol ise disülfid bağı oluşumunu engelleyerek ER'un fonksiyonunun bozulmasına sebep olur.

Alkilleyici ajanlardan olan MMS ise, DNA'ya zarar vermesinden ziyade, ER proteinlerindeki sistein rezidülerini alkilleyerek, ER proteinlerinin katlanmasını etkilemektedir. Bu sonuçlardan dolayı, Gadd153 geninin indüksiyonu, DNA hasarına nazaran ER stresine daha duyarlıdır. Gadd153 proteininin farelere mikroenjeksiyonu sonucunda, hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S fazında durduğu veya apoptozise yol açtığı görülmüştür ve bundan dolayı bu proteinin ER stresi ile indüklenmiş apoptoziste önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Matsumoto *et al.* 1996, Ron and Habener 1992, Oyadomari and Mori 2004). Bu gen ER stresi indüklenen apoptozise aracılık eden ilk gen olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, Gadd45 ve Gadd153 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinin, alkilleyici ajanlar aracılığıyla uyarıldığı gösterilmiştir. Ayrıca önce curcumin, sonra alkilleyici ajanların uygulandığı gruplarda da, Gadd45 ve Gadd153 mRNA ekspresyon düzeylerinin curcuminle uyarıldığı bulunmuştur. Saha ve ark.'nın (2010), insan akciğer kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmada, curcumin'in, Gadd45 ve Gadd153'ün mRNA ekspresyon düzeylerinin tümör baskılayıcı gen olan p53'e bağlı olmadan uyarıldığı ve apoptozise sebep olduğu bulunmuştur. Ayrıca curcumin'in kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S fazında durmasına yol açtığı belirtilmiştir (Saha et al. 2010).

Başka hücre hatları ile ilgili yapılan çalışmalarda da, curcumin'in Gadd45 ve Gadd153'ün mRNA düzeylerinin p53'den bağımsız bir şekilde uyarıldığı gösterilmiştir (Scott *et al.* 2005). Akciğer kanser hücre hattı olan PC-9'da yapılan bir çalışmada, Gadd45 ve Gadd153 mRNA ekspresyon seviyeleri RNA interferens yöntemi ile inhibe edildiği zaman, apoptozisin uyarılmasında curcumin'in rolünün azaldığı belirtilmiştir. Dolayısıyla kanserin curcumin ile önlenmesinde, Gadd genlerinin önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Saha *et al.* 2010).

Meme kanser hücre hattı olan MCF-7'de yapılan bir çalışmada, curcumin'in Gadd45 mRNA ekspresyon düzeyini 3 misli uyardığı bulunmuş ve bunun sonucunda curcumin'in apoptozisi uyardığı ve kanser tedavisinde koruyucu bir role sahip olduğunu vurgulamışlardır (Ramachandran *et al.* 2005). Çalışmamızda, doğrudan etkili alkilleyici ajan olan MMS'in oluşturduğu genotoksisitede, curcumin'in Gadd45 mRNA ekspresyon düzeyini 3 kat, Gadd153 mRNA ekspresyon düzeyini ise 3,4 kat uyardığı bulundu. Dolaylı yoldan etkili alkilleyici ajanlardan olan SP ise Gadd45 mRNA ekspresyon düzeyini 1 kat, Gadd153 mRNA ekspresyon düzeyini ise 3 kat uyardığı bulundu. Çalışmamızda curcumin'in MMS ve SP tarafından oluşturulan hasara karşılık bu genlerin ekspresyon düzeylerini arttırması, DNA tamir mekanizmalarının devreye girdiğini ve buna bağlı olarak curcumin'in koruyucu rol oynadığını göstermektedir.

DNA'ya zarar veren bir kimyasal olan benzopren (BaP) ile yapılan bir çalışmada, curcumin'in ve E vitamininin, BaP'nin oluşturduğu sitotoksisiteyi, ROS oluşumu ve DNA hasarını azaltarak, p53/PARP-1/survivin/Bax/Bcl-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini değiştirerek koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Zhu *et al.* 2014). Diyabetik ratlarla ilgili yapılan bir çalışmada curcumin, B hücre CLL/lemfoma 2 (Bcl-2), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ile glutatyon-S-transferaz mRNA ekspresyon düzeylerini arttırarak antidiyabetik etki göstermiştir (El-Bahr 2013).

Çalışmamızda, deneysel olarak MMS ve SP uygulanan farelerde DNA hasarı, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite (oksidatif stres indeksi) ile genotoksisite belirteci mikronukleus indeksi ve hücre büyümesini durduran ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan genlerden Gadd45 ve Gadd153'ün ifadelerindeki değişiklikler ve ile bunlara curcumin'in etkileri araştırıldı.

Önce curcumin, sonra MMS ve SP'in uygulandığı gruplarda, curcumin'in DNA hasar derecesini mononükleer lökositlerde azalttığı, kemik iliğinde oluşan mikronukleus sayısını azalttığı, plazmada oksidatif stresi azalttığı ve indüklenmiş DNA hasarının belirteci olan Gadd45 ve Gadd153'ün mRNA ekspresyon düzeylerinin uyarılmasını sağladığı bulundu. Sonuç olarak, doğrudan etkili alkilleyici ajanlardan olan MMS ve dolaylı yoldan etkili ajan olan SP uygulanan farelerde oluşan DNA hasarına veya genotoksisiteye yanıt olarak, fenolik bir bileşik olan curcumin'in, toksik etki oluşuktan sonra değil de, oluşmadan önce koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterildi. Buna bağlı olarak curcumin'in, günlük hayatta diyetle alınan bitkisel kaynaklardan biri olması, kolay uygulanabilir olması, ucuz olması, güvenilir olması, etki mekanizmasının tam olarak bilinmesine katkı sağlayarak, alternatif ve tamamlayıcı tıpta başta kanser olmak üzere birçok önemli genetik hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmasına olanak sağlayabilir. Fitokimyasallarla yapılacak olan çalışmalara ve farmakoloji gibi alanlara katkı sağlayabilir. Bu şekilde ilaç ve diyet olarak kullanımında günlük, haftalık ya da aylık dozlarına göre insanların daha bilinçli kullanmaları sağlanabilir. Bununla birlikte genetik düzeyde oluşacak değişikliklere bağlı olarak DNA hasarının indüklenmesi ile ilişkili olan gen ve proteinlere yönelik yapılacak yeni çalışmalara yön vererek genetik hastalıkların moleküler mekanizmalarının açığa çıkarılmasına ışık tutup literatüre önemli katkı sağlayabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aggarwal, B.B., Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B. and Ichikawa, H. (2006). Targeting signal-transducer- and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Annals of the New York Academy of the Sciences*, **1091**: 151-169.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Sağlık Dizisi, 5, ISBN:975-543-038-5, Konya.
- Ammon, H.P. and Wahl, M.A. (1991). Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Medica*, **57**: 1-7.
- Araújo, C.A. and Leon, L.L. (2001). Biological activities of Curcuma longa L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**: 723-728.
- Arlett, C.F., Plowman, F.N., Rogers, P.B., Parris, C.N., Abbaszadeh, F., Green, M.H., Bush, C., Foray, N. and Lehmann, A.R. (2006). Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *The British Journal of Radiology*, **79**: 510-517.
- Ayhancı, A. (1997). Siklofosfamid sitotoksitesinin çinko ile etkileşimi. Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 1-92.
- Azuine, M.A. and Bhide, S.V. (1992). Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutrition and Cancer*, **17**: 77-83.
- Bahr, SM. (2013). Curcumin regulates gene expression of insulin like growth factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **368**: 1-11.
- Balajee, A.S. and Bohr V.A. (2000). Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene*, **250**: 15-30.

- Biswas, J., Roy, S., Mukherjee, S., Sinha, D. and Roy, M. (2010). Indian spice curcumin may be an effective strategy to combat the genotoxicity of arsenic in Swiss albino mice. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, **11**: 239-247.
- Bütüner, B.D. and Kantarcı G. (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **35**: 149-170.
- Calabrese, V., Butterfield, D.A. and Stella, A.M (2003). Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stres tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *The Italian Journal of Biochemistry*, **52**: 177-181.
- Carlson, S.G., Fawcett, T.W., Bartlett, J.D., Bernier, M. and Holbrook, N.J. (1993). Regulation of the C/EBP-Related gene gadd153 by glucose deprivation. *Molecular and Cellular Biology*, **13**: 4636-4744.
- Carrier, F., Bae, I., Smith, M.L., Ayers, D.M. and Fornace, A.J. (1996). Characterization of the GADD45 response to ionizing radiation in WI-L2-NS cells, a p53 mutant cell line. *Mutation Research*, **352**: 79-86.
- Carrier, F., Georgel, P.T., Pourqier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y. and Fornace, A.J. (1999). Gadd45, a p53-responsive stres protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, **19**: 1673-1685.
- Chan, M.M. (1995). Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol*, **49**: 1551-1556.
- Corona, A., Urbina, P., Bobadilla, M., Vargas, J., Ramirez, M.A., Mendoza, M.L., Troyo, S., Diaz, P. And Corona, J.R. (2007). Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. *Journal of Applied Gnetics*, **48**: 389-396.
- Çavdar, C., Sifil, A. and Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma sistemi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **3**: 92-95.
- Çulcu, T. (2007). İnsan hücrelerindeki DNA hasar ve mutasyonlarının RAPD tekniği kullanılarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 1-106.



- Demirel, S. ve Zamani, A.G. (2002). Mikronukleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, **12**: 123-127.
- Deshpande, S.S., Ingle, A.D. and Maru, G.B. (1997). Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. *Cancer Letters*, **118**: 79-85.
- Dhawan, A., Baipayee, M. and Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assesment of DNA damage in diffrent models. *Cell Biology and Toxicology*, **25**: 5-32.
- Dikilitaş, M. ve Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda “Tek Hücre Jel” elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik Not): Comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **14**: 77-89.
- Diñer, Y. ve Kankaya, S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, **30**: 1365-1373.
- Duguid, J.R., Eble J.N., Wilson T.M., Kelley M.R. (1995). Differential cellular and subcellular expression of the human multifunctional apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme. *Cancer Research*, **55**: 6097-6102.
- Dündar Y. (2001). Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **2**: 131-138.
- Fan, W., Jin, S., Tong, T., Zhao, H., Fan, F., Antinore, M.J., Rajasekaran, B., Wu, M. and Zhan, Q. (2002). BRCA1 regulates GADD45 through its interactions with the OCT-1 and CAAT motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 8061-8067.
- Fornace, A.J., Alamo, I. and Hollander, M.C. (1988). DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**: 8800-8804.
- Fornace, A.J., Jackman, J., Hollander, M.C., Liebermann, B.H. and Liebermann, D.A. Genotoxic stres response genes and growth arrest genes gadd, MyD and other genes induced by treatments eliciting growth arrest. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **21**: 139-152.

- Fornace, A.J., Nebert, D.W., Hollander, M.C., Luethy, J.D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J. and Holbrook, N.J. (1989). Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Molecular and Cellular Biology*, **9**: 4196-4203.
- Franke, S.I., Pra D., Erdtmann, B., Henriques, J.A. and Silva, J. (2005). Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. *Mutagenesis*, **20**: 279-283.
- Gautam, S.C., Xu, Y.X., Pindolia, K.R., Janakiraman, N. and Chapman, R.A. (1998). Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). *Biochemical Pharmacology*, **55**: 1333-1337.
- Goel, A., Ajaikumar, B.K. and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin as “Curecumin” : From kitchen to clinic, *Biochemical Pharmacology*, **75**: 787-809
- Gollapudi, B.B., Jackson, K.M. and Stott, W.T. (1998). Hepatic lacI and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine. *Mutation Research*, **419**: 131-135.
- Hahm, E.R., Gho, Y.S., Park, S., Park, C., Kim, K.W. and Yang, C.H. (2004). Synthetic curcumin analogs inhibit activator protein-1 transcription and tumor-induced angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **321**: 337-344.
- Harkin, D.P., Bean, J.M., Miklos, D., Song, Y.H., Truong, V.B., Englert, C., Christians, C., Ellisen, L.W., Maheswaran, S., Oliner, J.D. and Haber, D.A. (1999). Induction of GADD45 JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, **97**: 575-586.
- Hengstler, J.G., Hengst, A., Fuchs, J., Tanner, B., Pohl, C. and Oesch, F. (1996). Induction of DNA crosslinks and DNA strands lesions by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450 2B1. *Mutation Research*, **373**: 215-223.
- Hildesheim, J. and Fornace, A.J. (2002). Gadd45a: An elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, **8**: 2475-2479.

- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Henmueller, L.A., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., Rosenberg, M.P., Zhan, Q., Morgan, W.F., Deng, C.X. and Fornace, A.J. (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature Genetics*, **23**: 176-184.
- Horvathova, E., Slamenova, D., Hlincikova, L., Mandal, T.K., Gabelova, A. and Collins, A.R. (1998). The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research*, **409**: 163-171.
- Islaih, M., Li, B., Kadura, I.A., Hubbard, J.L., Deahl, J.T., Altizer, J.L., Watson, D.E. and Newton, R.K. (2004). Comparison of gene expression changes induced in mouse and human cells treated with direct-acting mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **44**: 401-419.
- Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikula, J., Sikora, E., Franceschi, C., Cossarizza, A. and Bartosz, G. (1998). Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rats thymocytes. *FEBS Letters*, **433**: 283-297.
- Jin, S., Fan, F., Fan, W., Zhao, H., Tong, T., Blanck, P., Alamo, I., Rajasekaran, B. and Zhan, Q. (2001). Transcription factors Oct-1 and NF-YA regulate the p53-independent induction of the GADD45 following DNA damage. *Oncogene*, **20**: 2683-2690.
- Jones, E.A., Shahed, A. and Shoskes, D.A. (2000). Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavanoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. *Urology*, **56**: 346-351.
- Junk, N., Yi, Y.W., Kim, D., Shong, M., Hong, S.S., Lee, H.S. and Bae, I. (2000). Regulation of Gadd45 $\gamma$  expression by C/EBP. *European Journal of Biochemistry*, **267**: 6180-6187.
- Kastan, B. M., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia, *Cell*, **71**: 587-597.

- Kastan, B.M., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Teleangiectasia. *Cell*, **17**: 587-597.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V., Kelloff, G.J., Kaskey, R.B., Rao, C.V. and Reddy, B.S. (1999). Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Research*, **59**: 597-601.
- Kearsey, J.M., Coates, P.J., Prescott, A.R., Warbrick, E. and Hall, P.A. (1995). Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene*, **11**: 1675-1683.
- Kearsey, J.M., Shivji, M.K., Hall, P.A., Wood, R.D. (1995). Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? *Science*, **270**: 1004-1005.
- Khafif, A., Schantz, S.P., Chou, T.C., Edelstein, D. and Sacks, P.G. (1998). Quantitation of chemopreventive synergism between (-) -epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*, **19**: 419-424.
- Kirsh, V.M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub, R.U. and Decordier, I. (2003). Indirect of mechanism of genotoxicity, *Toxicology Letters*, **140-141**: 63-74.
- Kirsh-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van, H.P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, **392**: 19-30.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (2003). Genetik Kavramlar, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, 268-271.
- Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E. ve Selek, S. (2005) Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, **100**: 61-64.
- Kovalsky, O., Lung, F.D. and Peter, P. (2001). Oligomerization of human gadd45a protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 39330-39339.

- Kulaksız, G ve Sancar, A. (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, **32**: 104-111.
- Kumar, K.B.H. and Kuttan R. (2005). Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine*, **12**: 494-500.
- Kumari, S., Rastogi, R.P., Kanchan, L., Shailendra, P., Singh, N.P. and Sinha, R.P. (2008). DNA damage: Detection strategies. *Excli Journal*, **7**: 44-62.
- Kürkçü, E. (2008). Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümörlerinde Curcumin'in Arginaz Enzim Aktivitesi, Ornitin ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, 1-71.
- Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S. and Pardee, A.B. (2003). Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression virus replication. *Proceeding of the National Academy Science of the Unites State of America*, **90**: 1839-1842.
- Liebarmann, D.A. and Hoffman, B. (2007). Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **39**: 329-335.
- Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A., Dunn, F.W. (1997). Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Letters*, **116**: 197-213.
- Lin, J.K. and Lin-Shiau, S.Y. (2001). Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proceeding of the National Science Council Republic of China*, **25**: 59-66.
- Loeb, L.A. and Preston, B.D. (1986). Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annual Review of Genetics*, **20**: 201-230.
- Lovat, P.E., Oliverio, S., Corazzari, M., Ranalli, M., Pearson, A., Melino, G., Piacentini, M. and Redfern, C. (2003). Induction of GADD153 and Bak: novel molecular targets of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Letters*, **197**: 157-163.

- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J. and Srimal, R.C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*, **78**: 2081-2087.
- Maheswaran, S., Park, S., Bernard, A., Morris, J.F., Rauscher, F.J., Hill, D.E. and Haber, D.A. (1993). Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proceeding of National of Academy Science*, **90**: 5100-5104.
- Majithiya, J.B., Balaraman, R., Gridhar, R. and Yadav, M.R. (2005). Effect of bis[curcumino]oxovanadium complex on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **18**: 211-217.
- Manach, C., Hubert, J., Llorach, R. and Scalbert, A. (2009). The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**: 1303-1315.
- Matalon, S.T., Ornoy, A. and Lishner, M. (2004). Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta). *Reproductive Toxicology*, **18**: 219-230.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Dercordier, I. and Kirsh, V.M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, **88**: 1515-1531.
- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y. and Akaro, S. (1996). Ectopic expression of CHOP (GADD153) induced apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Letters*, **395**: 143-147.
- McKullough, K.D., Martindale, J., Klotz, L.O., Aw, T.K. and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and Cellular Biology*, **21**: 1249-1259.
- Menon, V.P. and Sudheer A.R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **595**: 103-125.

- Mohan, R., Sivak, J., Ashton, P., Russu, L.A., Pham, B.Q., Kasahara, N., Raizman, M.B. and Fini, M.E. (2000). Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**: 10405-10412.
- Mortelmans, K. and Rupa, D.S. (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologist. *Advances in Applied Microbiology*, **56**: 379-401.
- Nakayama, K., Hara, T., Hibi, M., Hirano, T. and Miyajima, A. (1999). A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. *The Journal of Bioogical Chemistry*, **274**: 24766-24772.
- Onur, E., Tuğrul, B. and Bozyiğit, F. (2009). DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* **7**: 61-70.
- Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communiations*, **123**: 291-298.
- Oyadomari, S. and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stres. *Cell Death and Differantation*, **11**: 381-389.
- Pandya, U., Saini, M.K., Jin, G.F., Godley, B.F. and Awasthi, Y.C. (2000). Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicology Letters*, **115**: 195-204.
- Pfaffl, M.W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, **29**: 2002-2007.
- Phan, T.T., See, P., Lee, S.T. and Chan, S.Y. (2001). Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *The Journal of Trauma*, **51**: 927-931.
- Priyadarsini, K.I. (1997). Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radical Biology & Medicine*, **23**: 838-843.

- Rasmussen, H.B., Christensen, S.B., Kvist, L.P. and Karazmi, A. (2000). A simple and efficient separation of curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Medica*, **66**: 396-398.
- Raspor, P., Plesnicar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., Logar-Marinsek, R. and Poljsak, B. (2005). Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2- carboxyl acid). *Cell Biology International*, **29**: 57-63.
- Reddy, A.C and Lokesh, B.R. (1994). Studies of inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **137**: 1-8.
- Robinson, T.P., Ehlers, T., Hubbard, IV R.B., Bai, X., Arbiser, J.L., Goldsmith, D.J. and Bowen, J.P. (2003). Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: aromatic enone and dienone analogues of curcumin. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **13**: 115-117.
- Ron, D. and Habener, J.F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes&Development*, **6**: 439-453.
- Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Fujii, A., Suganuma, M. and Fujiki, H. (2010). Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "Growth Arrest and DNA Damage Inducible Genes 45 and 153". *Biological&Pharmaceutical Bulletin*, **33**: 1291-1299.
- Sajithlal, G.B., Chtihra, P. and Chandrakasan, G. (1998). Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochemical Pharmacology*, **56**: 1607-1614.
- Salvador, J.M., Hollander, M.C., Nguyen, A.T., Kopp, J.B., Barisoni, L., Moore, K.M., Ashwell, J.D. and Fornace, A.J. (2002). Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity*, **16**: 499-508.
- Scartezzini, P. and Speroni, E. (2000). Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**: 23-43.



- Senthilkumar, S., Devaki, T., Manohar, B.M. and Babu, M.S. (2006). Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clinica Chimica Acta, International Journal of Clinical Chemistry*, **364**: 335-342.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J. and Steward, W.P. (2005). Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, **41**: 1955-1968.
- Shim, J.S., Kim, D.H., Jung, H.J., Kim, J.H., Lim, D., Lee, S.K., Kim, K.W., Ahn, J.W., Yoo, J.S., Rho, J.R., Shin, J. and Kwon, H.J. (2002). Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**: 2987-2992.
- Sidhu, G.S., Singh, A.K., Thaloor, D., Banaudha, K.K., Patnaik, G.K., Srimal, R.C. and Maheshwari, R.K. (1998). Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen*, **6**: 167-177.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**: 184-191.
- Singh, S.V., Hu, X., Srivastava, S.K., Singh, M., Xia, H., Orchard, J.L. and Zaren, H.A. (1998). Mechanism inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice dietary curcumin. *Carcinogenesis*, **19**: 1357-1360.
- Smith, M.L. and Seo, Y.R. (2002). P53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis*, **17**: 149-156.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, B.M., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J. (1994). Interaction of the p53-regulated protein gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, **266**: 1376-1380.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C. and Fornace, A.J. (2000). P53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21 and/or gadd45 genes. *Molecular and Cellular Biology*, **20**: 3705-3714.
- Smith, M.L., Kontny, H.U., Zhan, Q., Sreenath, A., O'Connor P.M. and Fornace, A.J. (1996). Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cell to u.v.- irradiation or cisplatin. *Oncogene*, **13**: 2255-2263.

- Sreejayan, N. and Rao, M.N. (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung*, **46**: 169-171.
- Swarnakar, S., Gangulky, G., Kundu, P., Banerjee, A., Maity, P. and Sharma, A.V. (2005). Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 9409-9415.
- Şekeroğlu, A.Z. and Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *Tıbbi Bilim Dergisi*, **4**: 221-229.
- Takekawa, M. and Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*, **95**: 521-530.
- Thaloor, D., Singh, A.K., Sidhu, G.S., Prasad, P.V., Kleinman, H.K. and Maheshwari, R.K. (1998). Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differentiation*, **9**: 305-312.
- Thiyagarajan, M. and Sharma, S.S. (2004). Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*, **74**: 969-985.
- Tice, R.R., Aquarell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**: 206-221.
- Tietz, N.W. (1995). *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Tohda, C., Nakayama, N., Hatanaka, F. and Komatsu, K. (2006). Comparison of anti-inflammatory activities of six *Curcuma* rhizomes: A possible curcuminoid-independent pathway mediated by *Curcuma phaeocaulis* extract. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **3**: 55-60.
- Tosetti, F., Noonan, D.M. and Albini A. (2009). Metabolic regulation and redox activity as mechanisms for angioprevention by dietary phytochemicals. *International Journal of Cancer*, **125**: 1997-2003.

- Üstüner, D. (2011). Kromozom kırıkları ve mikronukleus-apoptoz bağlantısı. *TUBAV Bilim Dergisi*, **4**: 64-69.
- Vairapandi, M., Balliet, A.G., Fornace, A.J., Hoffman, B. and Liebermann, D.A. (1996). The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1. *Oncogene*, **12**: 2579-2594.
- Verjat, T., Dhenaut A., Radicella J.P. and Araneda S. (2000). Detection of 8-oxoG DNA glycosylase activity and OGG1 transcripts in the rat CNS. *Mutation Research*, **460**: 127-38.
- Vrzoc, M. and Petras, M. (1997). Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutation Research*, **381**: 31-40.
- Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendersot, L.M. and Ron, D. (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Molecular and Cellular Biology*, **16**: 4273-4280.
- Yırtıcı, Ü. (2007). Tartrazin'in *Cyprinus Carpio*'daki Genotoksik Etkisinin Mikronukleus Yöntemi ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, 1-80.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **44**: 363-371.
- Zhan, Q. (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, **569**: 133-143.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Hurriss, C.C. and Fornace, A.J. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, **18**: 2892-2900.
- Zhan, Q., Fan, S., Smith, M.L., Bae, I., Yu, K., Alamo I., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J. (1996). Abrogation of p53 functions affects gadd genes responses to DNA base-damaging agents and starvation. *DNA and Cell Biology*, **15**: 805-815.

- Zhan, Q., Lord, K.A., Alamo, I., Hollander, M.C., Carrier, F., Ron, D., Kohn, K.W., Hoffman, B., Liebermann, D.A. and Fornace, A.J. (1994). The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, **14**: 2361-2371.
- Zhan, W., Bae, I., Krishnaraju, K., Azam, N., Fan, W., Smith, K., Hofmann, B. and Liebermann, D.A. (1998). Cr6: A third member in the MyD118 and gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene*, **18**: 4899-4907.
- Zhang, F., Altorki, N.K., Mestre, J.R., Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A.J. (1999). Curcumin inhibits cyclooxygenase-2-transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*, **20**: 445-451.
- Zhao, H., Jin, S., Fan, F., Fan, W., Tong, T., Zhan, Q. (2000). Activation of the transcription factor Oct-1 in response to DNA damage. *Cancer Research*, **60**: 6276-6280.
- Zheng, W. and Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 5165-70.
- Zinsner, H., Kuroda, M., Wang, X.Z., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens J.L. and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, **12**: 982-995.
- Zhu, W., Cromie, M., Cai, Q., Tangfeng, Lv., Singh, K. and Gao, W. (2014). Curcumin and Vitamin E protect against adverse effects of Benzo[a]pyrene in lung epithelial cells. *PloS One*, **9**: 1-11.

## **İnternet Kaynakları**

1. <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>, 25.03.2014.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nilay İŞİTEZ  
Doğum Yeri ve Tarihi : Afyonkarahisar/03.03.1982  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) : 0 506 338 28 28/nil\_ersoz@hotmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Afyon Lisesi (1996-1999)  
Lisans : Süleyman Demirel Üniv. Biyoloji Bölümü (2000- 2004)  
Yüksek Lisans : Selçuk Üniv. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2005-2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Afyon Kocatepe Üniv. Hastanesi (2007-2011)

Yayımları (SCI ve diğer) :

Ersöz, N., Hepdoğru, M., Can, İ., Arıkoğlu, H., Paydak, F., Gök, H. and Arıbaş, A. (2007). Transkripsiyon faktörü MEF2A gen mutasyonlarının Türk toplumundaki koroner arter hastalarında taranması, IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Bildiri Özet Kitabı, 6-9 Eylül, Antalya.

Özdemir, H., Arıkoğlu, H., İşitez, N., Kaya, D.E., Can, İ., Karaoğlu, N. and Turhan, A.B. (2009). Konya bölgesinde koroner arter hastalığı ile IRS1 genindeki A972R polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması, XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Bildiri Özet Kitabı, pp115, 28-31 Ekim, Bodrum, Muğla.

Ciğerci, İ.H., İşitez, N., Konuk, M., Yağız, D. and Afyon, A. (2010). Basidiomycetes'lerden yenebilen bazı mantarların oksidatif DNA hasarına etkileri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, pp250, 21-25 Haziran, Denizli.

Arıkoğlu, H., Erkoç, D.E., İşitez, N., Zeybek, S., Ünal, S.E., İşçioğlu, F. and Can, İ. (2013). Transkripsiyon faktörü 7 benzeri-2 (TCF7L2) genindeki rs7903146 (C/T) polimorfizminin Türk populusyonunda koroner arter hastalığı ile ilişkisi bakımından taranması, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Bildiri Özet Kitabı, 333-334, 27-30 Ekim, Kuşadası, İzmir.