



**DNA Hasarına Karşı *Plantago lanceolata* Ekstraktının ve  
Luteolin-7-B-D-Glizozit'in İnsan Lenfosit ve Hep-G2  
Hücrelerinde İyileştirici Etkilerinin Araştırılması**

**Merve BENZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL**

**Yüksek Lisans - 2020**

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DNA HASARINA KARŞI *PLANTAGO LANCELOTA* EKSTRAKTININ VE  
LUTEOLİN-7-B-D-GLİGOZİT'İN İNSAN LENFOSİT VE HEP-G2  
HÜCRELERİNDE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Merve BENZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Şengül YÜKSEL**

**MALATYA**  
**2020**

 İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	<b>KABUL ONAY FORMU</b>	Doküman No	
		Yayın Tarihi	
		Revizyon No	
		Revizyon Tarihi	
		Sayfa No	

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

DNA Hasarına Karşı Plantago Lanceolata Ekstratının ve Luteolin-7-B- D Glikozit'in İnsan Lenfosit ve Hep-G2 Hücrelerinde İyileştirici Etkilerinin Araştırılması  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
PROF. DR. ŞENGÜL YÜKSEL

**HAZIRLAYAN**  
MERVE BENZER

Jürimiz tarafından 16.03.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda bu tez **oybirliği** ile başarılı bulunarak Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul etmiştir.

**Jüri Üyelerinin Unvanı Adı Soyadı**

1. PROF. DR. ŞENGÜL YÜKSEL
2. PROF. DR. ELİF YEŞİLADA
3. DR. ÖĞR. ÜYESİ ELÇİN LATİFE ASLAN

**İmza**



**O N A Y**

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve 20.../..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

**Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**  
Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>Plantago lanceolata</i> 'nın Özellikleri ve Taksonomisi .....	3
2.2. Flavonoidler .....	8
2.3. Luteolin .....	10
2.4. DNA Hasarları ve Tamir Mekanizmaları .....	12
2.5 Genotoksisite .....	13
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Araçlar .....	19
3.2. Çalışmada Kullanılan Metodlar .....	23
4. BULGULAR.....	33
4.1. <i>P. lanceolata</i> 'nın ve LDG'nin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri .....	33
4.2. <i>P. lanceolata</i> 'nın ve LDG'nin Lenfosit Hücrelerinde Komet Parametreleri Üzerine Etkileri.....	37
4.3. <i>P. lanceolata</i> 'nın ve LDG'nin HepG-2 hücrelerinde komet parametreleri üzerindeki etkileri .....	42
5. TARTIŞMA .....	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	61
KAYNAKLAR .....	62
EKLER.....	78
EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....	78
EK-2 ETİK KURULU RAPORU.....	79

## TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında bana rehberlik eden ilgisini, yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Şengül YÜKSEL'e teŐekkür ederim.

Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya ve Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, yüksek lisans eğitiminin boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teŐekkür ederim.

Yaptığım alıŐmada *Plantago lanceolata* bitkisini tanımlayan Doç. Dr. Turan ARABACI'ya teŐekkür ederim. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Harika GÖZÜKARA BAĞ'a teŐekkür ederim. ÇalıŐmalarım boyunca beni destekleyen hep yanımda olan değerli aileme ve yüksek lisans eğitiminin boyunca her konuda desteğini esirgemeyen sınıf arkadaşlarıma teŐekkür ederim.

## ÖZET

### DNA Hasarına Karşı *Plantago lanceolata* Ekstraktının ve Luteolin-7-B-D-Gligozit'in İnsan Lenfosit ve Hep-G2 Hücrelerinde İyileştirici Etkilerinin Araştırılması

**Amaç:** *Plantago lanceolata* (*P. lanceolata*), başta yara iyileştirme olmak üzere çeşitli hastalıkların iyileştirilmesi veya belirtilerinin giderilmesi amacıyla tüketilen fitoterapötik bir bitki türüdür. Luteolin-7-B-D-gligozit (LDG) ise antioksidan, antigenotoksik ve antikanserojen özellikleri ile bilinen ve *P. lanceolata*'nin en önemli komponentlerinden olan bir flavoanoidtir. Bu çalışmada insan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde *P. lanceolata*'nın metanol ekstraktının ve LDG'nin olası antigenotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmada insan lenfosit ve Hep-G2 hücreleri kullanıldı. DNA hasarı olan ve olmayan hücelere *P. lanceolata* metanol ekstraktının 200 ve 500 µg/ml ile LDG'nin 10, 20 ve 30 µM dozları uygulanarak kardeş kromatid değişim testi (KKD) ve komet analizleri ile antigenotoksik etkileri incelendi.

**Bulgular:** Çalışma grupları arasında sadece bitki ekstraktının yüksek dozu KKD frekansını artırdı. Lenfosit hücrelerinde sadece *P. lanceolata* ekstraktı ve LDG'nin en yüksek konsantrasyonları komet parametrelerini artırarak genotoksik etki gösterirken DNA hasarlı hücrelerde tüm test maddelerinin uygulama dozları genotoksisiteyi azaltıcı etki gösterdi. HepG2 hücrelerinde ise hem bitki ekstraktının hem de LDG'nin tüm konsantrasyonları komet oluşumunu artırarak genotoksik etki gösterirken DNA hasarlı hücrelerde ise bitki ekstraktı grupları ile LDG'nin minimum konsantrasyonunun genetik hasarı azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi.

**Sonuç:** *P. lanceolata* bitkisi ve LDG insan lenfosit hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda anti-genotoksik yüksek konsantrasyonlarda ise genotoksik etki gösterirken HepG2 hücrelerinde tüm konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterdi. Böylece *P. lanceolata* bitkisinin ve LDG'nin doza bağlı olarak sağlıklı hücrelerde antigenotoksik, kanser hücrelerinde ise genotoksik etki göstererek antikanserojen olduklarını söyleyebiliriz.

**Anahtar kelimeler:** Antikanserojen, genotoksisite, Hep-G2, lenfosit, Luteolin-7-B-D-gligosid, *P. Lanceolata*.

## ABSTRACT

### **Investigation of the Therapeutic Effects of *Plantago lanceolata* Extract and Luteolin-7-B-D-Glycoside Against DNA Damage on Human Lymphocyte and Hep-G2 Cells**

**Aim:** *Plantago lanceolata* (*P. lanceolata*) is used a phytotherapeutic plant consumed to treat or avoid of symptoms of various diseases. Luteolin-7-B-D-glycoside (LDG) is a flavonoid which is known for its antioxidant, antigenotoxic and anticarcinogenic properties and is one of the most important components of *P. lanceolata*. This study aimed to investigate the possible antigenotoxic effects of the methanol extract of *P. lanceolata* and LDG on human lymphocyte cells and Hep-G2 cells.

**Materials and Methods:** This study were used human lymphocyte cells and Hep-G2 cells. The DNA damaged and undamaged cells were treated with 200 and 500 µg/ml of *P. lanceolata* methanol extract and 10, 20 and 30 µM doses of LDG and examined sister chromatid exchange test (SCE) and antigenotoxic effect.

**Results:** Among the study groups, only high dose of plant extract increased the frequency of SCE. In lymphocyte cells only the highest rates of *P. lanceolata* extract and LDG have a effect by increasing the parameters of the comet, whereas in DNA damaged cells, all test applications application doses have a reducing effect on genotoxicity. In HepG2 cells, all concentrations of both plant extract and LDG showed a genotoxic effect by increasing the formation of comet, whereas in DNA damaged cells, the minimum concentration of plant extract groups and LDG were found to reduce genetic damage.

**Conclusion:** *P. lanceolata* and LDG have anti-genotoxic effect at low concentrations and genotoxic effect at high concentrations in human lymphocyte cells, while genotoxic effect at all concentrations in HepG2 cells. We can say *P. lanceolata* plant and LDG that it is antigenotoxic effect showing in non-damage cells dose dependent, while anticarcinogenic effect showing in non-damage cancer cells.

**Key words:** Anticancerogenic, genotoxicity, Hep-G2, lymphocyte, Luteolin-7-B-D-glycoside, *P. lanceolata*.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BrdU</b>	: Bromodeoksiüridin
<b>CCK</b>	: Hücre sayma kiti
<b>CDK</b>	: Cyclin dependent kinase
<b>CDK1</b>	: Cyclin dependent kinase 1
<b>CDK2</b>	: Cyclin dependent kinase 2
<b>CoCl</b>	: Kobalt klorür
<b>COX- 2</b>	: Cyclooxygenase-2
<b>CP</b>	: Siklofosfamid
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EMT</b>	: Epithelial-mesenchymal transition
<b>GC</b>	: Gastric cancer
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>Hela</b>	: Rahim kanseri hücre hattı
<b>HepG2</b>	: Hepatosellüler karsinoma hücre hattı
<b>HT-29</b>	: insan kolon kanseri hücre hattı
<b>IL-1</b>	: İnterlökin 1
<b>IL-6</b>	: İnterlökin 6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin 8
<b>LDG</b>	: Luteolin-7-B-D-gligozit
<b>KKD</b>	: Kardeş kromatid değişimi
<b>KA</b>	: Kromozom aberasyonu
<b>MCF-7</b>	: Meme kanseri hücre hattı



<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>MDA-MB-231</b>	: Meme kanseri hücre hattı
<b>MI</b>	: Mitotik indeks
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>NO</b>	: Nitrikoksit
<b>OCM-1</b>	: Ocular Choroidal Melanoma-1
<b>OH</b>	: Hidroksil
<b>PC-3</b>	: Prostat kanser hücresi
<b>RI</b>	: Replikasyon indeksi
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>STAT-3</b>	: Onkogen protein
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör alfa
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>g</b>	: Mikrogram

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Sekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. <i>P. lanceolata</i> 'nın genel görünümü .....	3
Şekil 2.2. <i>P. lanceolata</i> 'nın kök, çiçek, yaprak kısımları.....	4
Şekil 2.3. Flavonoidlerin genel yapısı .....	8
Şekil 2.4. Luteolin (1), luteolin 7-O-glukosid (2), luteolin-8-C <sub>1</sub> -β-D-glukopiranosid (3), luteolin-7-O-β -rutinosid (4).....	11
Şekil 2.5. Luteolinin etki mekanizması .....	12
Şekil 2.6. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları .....	14
Şekil 2.7. BrdU ile kardeş kromatit değişiminin belirlenmesi .....	15
Şekil 2.8. Mikronükleus oluşumu a) Anafazda geri kalan kromozomların oluşturduğu MN b) Asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan MN, ve sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu.....	16
Şekil 2.9. Komet yöntemi ile farklı seviyelerdeki DNA hasarları a) Hasarsız; b) Çok az hasarlanmış DNA; c) Az hasarlanmış DNA; d) Hasarlanmış DNA; e) Tümüyle hasarlanmış DNA.....	18
Şekil 2.10. Komet analiz çalışmasının aşamaları; (1) %1 lik HMA agarozun hazırlanması, (2) Test maddesinden DNA izolasyonu yapılması (3) 1:1 oranında hücre karışımı ile %1 lik LMA karışımının HMA agaroz kaplı lamın üzerine eklenmesi (4) HMA ve hücre ile karışık LMA ile preperat, (5) Elektroforez tamponunda DNA gevşemesi için soğuk ortamda bekletilmesi, (6) Elektrik akımı altında elektroforez uygulaması, (7) Preparatların en az üç kez nötralizasyon solüsyonunda yıkanması, (8) 100µl Ethidium bromid ile (20 µg/ml-1) boyanması, (9) Floresan mikroskopta görüntülenmesi, (10) DNA hasarının görsel analiz edilmesi .....	18
Şekil 3.1. Luteolin-7-β-D glucoside'nin açık formülü .....	19
Şekil 3.2. DMSO'nun açık formülü.....	19
Şekil 3.3. EDTA'nın açık formülü .....	20
Şekil 3.4. Tris-hidroklorid'nin açık formülü .....	21
Şekil 3.5. EtBr'nin açık formülü .....	21
Şekil 3.6. Hidrojen peroksitin kimyasal yapısı.....	22

<b>Şekil 3.7.</b> Tanımlanmış olan <i>P. lanceolata</i> .....	23
<b>Şekili 3.8.</b> A; <i>P. lanceolata</i> `nın 40 g kurutulmuş yaprakları, B; <i>P. lanceolata</i> `nın 40 g kurutulmuş yaprakların 400 ml`lik methanolle karışımı.....	24
<b>Şekil 3.9.</b> KKD `nin boyama sonucunda ki görüntüsü.....	27
<b>Şekil 3.10.</b> Lenfosit izalasyon aşama görüntüsü.....	28
<b>Şekil 3.11.</b> Lenfosit hücrelerinin thoma lamında görünümü.....	28
<b>Şekil 3.12.</b> Floresan mikroskobunda KOMET görüntüsü A) Hasarsız DNA, B) Hasarlı DNA görüntüsü.....	31
<b>Şekil 4.1.</b> <i>P. lanceolata</i> ekstratı ve LDG`nin ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde KKD sıklığının grafik halinde gösterilmesi. P-değeri <0,001`dir.....	34
<b>Şekil 4.2.</b> <i>P.lanceolata</i> 200 µg/ml ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi. (x1000).....	34
<b>Şekil 4.3.</b> <i>P.lanceolata</i> 500 µg/ml ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi. (x1000). .....	35
<b>Şekil 4.4.</b> LDG farklı dozlarının muamelesinden elde edilen KKD görüntüsü A; 10 µM B; 20 µM, C; 30 µM (x1000). .....	36
<b>Şekil 4.5.</b> Lenfosit hücrelerinde <i>P. lanceolata</i> (PL), LDG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> `li kombine gruplarının farklı doz uygulamaları sonucu alkali komet skorlarının gösterimi (P <0,001).....	39
<b>Şekil 4.6.</b> Lenfosit hücrelerinde örnek komet görüntüleri A; Kontrol grubu, B; Pozitif kontrol grubu (200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), C; 200 µg/ml <i>P. lanceolata</i> grubu, D; 200 µg/ml <i>P. lanceolata</i> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu, E; 500 µg/ml <i>P. lanceolata</i> grubu, F; 500 µg/ml <i>P. lanceolata</i> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu. ....	40
<b>Şekil 4.7.</b> Lenfosit hücrelerinde örnek komet görüntülerinin devamı G; 10 µM LDG grubu, H; 10 µM LDG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu, I; 20 µM LDG grubu, J; 20 µM LDG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu, K; 30 µM LDG grubu, L; 30 µM LDG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubu. ....	41
<b>Şekil 4.8.</b> Hep-G2 hücrelerinde <i>P. lanceolata</i> (PL), LDG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> `li kombine gruplarının farklı doz uygulamaları sonucu alkali komet skorlarının gösterimi (P <0,001).....	44

**Şekil 4.9.** Hep-G2 hücrelerinde örnek komet görüntüleri A; Kontrol grubu, B; Pozitif kontrol grubu (200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), C; 200 µg/ml *P. lanceolata* grubu, D; 200 µg/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, E; 500 µg/ml *P. lanceolata* grubu, F; 500 µg/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu. .... 45

**Şekil 4.10.** Hep-G2 hücrelerinde örnek komet görüntülerinin devamı G; 10 µM LDG grubu, H; 10 µM LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, I; 20 µM LDG grubu, J; 20 µM LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, K; 30 µM LDG grubu, L; 30 µM LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu. .... 46



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1.</b> <i>P. lanceolata</i> 'nın geleneksel tedavi amaçlı kullanımı .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> <i>P. lanceolata</i> 'nın kütle spektrometresi ile elde edilen kimyasal bileşenleri.....	6
<b>Tablo 2.2.</b> <i>P. lanceolata</i> 'nın kütle spektrometresi ile elde edilen kimyasal bileşenlerin devamı .....	7
<b>Tablo 2.3.</b> Flavonoidlerin iskelet yapısına göre çeşitleri .....	9
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan gruplar. ....	25
<b>Tablo 4.1.</b> Değişik dozlarda <i>P. lanceolata</i> ve LDG'nin ile muamele edilmiş olan insan periferik lenfositlerinde ortalama KKD sayısı.....	33
<b>Tablo 4.2.</b> <i>P. lanceolata</i> ekstraktı ve LDG'nin farklı dozları ile 24 saat muamele edilen lenfositlerde komet hasar skorlarının karşılaştırılması. ....	38
<b>Tablo 4.3.</b> <i>P. lanceolata</i> ekstraktı ve LDG'nin farklı dozları ile 24 saat muamele edilen Hep-G2 hücrelerinde komet hasar skorlarının karşılaştırılması. ....	43

# 1. GİRİŞ

Fitoterapi; bitkilerin çeşitli kısımlarıyla (çiçek, yaprak, kök, tohum, kabuk ve meyve) ya da bitki kısımlarının kombinasyonuyla oluşturulan bitkisel ürünlerin, hastalıkların tedavisi için kullanılmasıdır (1). Günümüzde modern tıp alanında kimyasal ilaç kullanımı hastalıkların tedavisinde hızlı bir etki gösteriyor olsa da; yan etkilerinin çok olması ve immün sistemine zarar vermesi nedeniyle insanları, bitkisel destekli tedaviye yöneltmiş ve bu sayede fitoterapiye olan ilgi artmıştır (2). Tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat, yaptığı çalışmalarla bitkileri tedavi amaçlı kullanmış ve birçok hastalığı iyileştirmiştir. Tedavi amaçlı bitki kullanımı günümüzde de önemini kaybetmeyip, bitkilerle tedavi anlamına gelen fitoterapinin oluşumuna katkı sağlamıştır (2).

*Plantago* cinsi dünyada geniş bir dağılımı olan çalı ya da çok yıllık bitkilerden oluşmaktadır. Türkiye’de 21 türü bulunmakta olup *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* (*P. lanceolata*) en yaygın türleridir (3, 4). Fitoterapi de kullanımı geniş olmakla birlikte çocuk maması, salata ve hayvan yemi olarak ta tüketilmektedir (5, 6).

*P. lanceolata*; sinir otu, damar otu, sinirli yaprak, bağa yaprağı ve ateş yaprağı olarak da adlandırılan Anadolu’da yaygın görülen bir bitki türüdür. Sinir otunun; uzun yapraklı sinir otu (*P. lanceolata*) ve yapraksız sinir otu (*P. major*) olarak iki alt türü bulunmaktadır. Bu bitkilerin toprak üstü kısımları, özellikle yaprakları halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bitki ekstraktları, özellikle deride meydana gelen yaraların iyileştirilmesinde, bağışıklık sistemini güçlendirmede, solunum, sindirim ve ürogenital sistem hastalıklarında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (7, 8). Ayrıca ağrıların, çibanların tedavisinde, cilt üzerindeki dermatolojik tedavide kullanılmaktadır. Astım tedavisi için; çay, şurup ve hap olarak kullanılmaktadır (9). *P. lanceolata*; flavonoidler (baisalein, luteolin), monoterpenoidler (linalool), triterpenoidler (oleanolik asit, urkolik asit), iridoidglikozidler (aukubin) ve fenolik bileşenler bakımından zengindir. *P. lanceolata* bitkisindeki bileşenlerden olan glikozit ve fenol bitkiye anti-inflamatuvar özellik kazandırmaktadır. Luteolin-7-B-D-glikozit (LDG) flavonoidi *P. lanceolata* bitkisinin en önemli bileşenlerinden olup çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurabilen güçlü bir antikanserojenik ajan olarak bildirilmiştir (10). Luteolin’in mide kanserinde hücre poliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu doza bağımlı olarak baskıladığı ve apoptozu indüklediği ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişi

tersine çevirerek mide kanserinin ilerlemesini durdurduğu rapor edilmiştir (11). Luteolin, bir anti-enflamatuar ve antikanser gibi çeşitli yararlı özelliklere sahiptir. Bu özelliklerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

Genotoksisite testleri, etki mekanizmalarına göre *in vivo* veya *in vitro* olarak çalışılabilmektedir. Genotoksisite testleri moleküler ve kromozom düzeyinde olabilmektedir. Genotoksisite araştırmalarında, DNA hasarının direkt belirlenmesi amacıyla yapılan komet testi bulunmaktadır. Kromozom düzeyinde genotoksisite araştırmalarında ise sitogenetik testler olan kardeş kromaid değişim testi (KKD), kromozom aberrasyon testi (KA) ve mikronükleus testi (MN) kullanılmaktadır. KKD, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (12).

*P. lanceolata* ve LDG'nin sitogenetik ve genotoksik etkilerine yönelik yapılan çalışmalar çok kısıtlıdır. İnsan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde DNA hasarına karşı *P. lanceolata* ve LDG'in etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu çalışmada DNA hasarı oluşturulmuş insan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde, *P. lanceolata*'nın metanol ekstraktının ve LDG'nin doza bağlı olarak olası iyileştirici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Başka araştırmacıların daha önceden yaptıkları çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek bulgulara dayanarak *P. lanceolata*'nın ve LDG'nin DNA koruyucu etkileri hakkında yeni bilgilerin ortaya çıkması beklenmektedir. Bu kimyasalların moleküler ve hücresele düzeyde fayda/zarar değerlendirmesi mümkün olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Plantago lanceolata*'nın Özellikleri ve Taksonomisi

*P. lanceolata*; Plantaginaceae familyasından bir tür olup fitoterapi açısından önemli bir bitkidir. Fitoterapide ve halk arasında sindirim-solunum organları, deri- infeksiyon hastalıkları, ağrı, kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (13). Halk arasında bağa yaprağı, ateş yaprağı, sinirli yaprak, sinir otu, İngiliz sinir otu, dar yapraklı sinirli ot, geyik boynuzu sinir otu, kuzu dili, damarlı ot gibi birçok isimle bilinmektedir (Şekil 2.1)( 9, 14). Sınıflandırması ise şu şekildedir;

Alem: *Spermatophyta*

Şube: *Angiospermae*

Sınıf: *Asteridae*

Takım: *Plantaginales*

Aile: *Plantaginaceae*

Cins: *Plantago*

Tür: *Plantago lanceolata* L. (sinirli ot) (14)



Şekil 2.1. *P. lanceolata*'nın genel görünümü (15).



*P. lanceolata* L. çeşitli toprak tipinde yetişebildiği halde en iyi nötür topraklarda yetişmektedir (7, 16). Tarla, bahçe, yol kenarında ve nemli arazilerde kendiliğinden yetişir. Dünya üzerinde yaygın olarak bulunsada en çok Avrupa ve Asyada dağılım göstermektedir (17,16). *P. lanceolata*`nın kök ve sap kısımları kalın, çiçek taşıyan saplar tüylü ve yapraksızdır. Çiçek taşıyan saplar 10-60 cm uzunluğunda, çiçekler ise 4 mm uzunluğunda kaliks, yeşil, korolla kahverengi rengindedir. Her çiçek en az iki tohum üretebilir. Dip yapraklar mızraksı, yana doğru yayılmış veya dik vaziyette, 3-5 kadar belirgin paralel damarlı, dar ve kısa saplıdır (Şekil 2.2). *P. lanceolata* hem erkek hem de dişi organına sahiptir (Hermafrodittir). Nisan-Ağustos aylarında çiçeklenir ve tohumlar Haziran-Eylül ayları arasında olgunlaşır (18).



Şekil 2.2. *P. lanceolata*`nın kök, çiçek, yaprak kısımları (19).

Geleneksel olarak insan ve hayvanlarda gıda tüketimi, sağlık problemlerinin iyileştirilmesi alanlarında ve tekstil gibi çeşitli alanlarda kullanımı bulunmaktadır. *P. lanceolata*'nın tedavi amaçlı kullanılan kısımları yaprak ve tohumlarıdır. Bitkinin yapraklarının; idrar söktürücü, deri hastalıklarında, alerjik durumlarda, ağız ve boğaz iltihabı yaralarında, soğuk algınlığı, öksürük, astım, bronşit, ateş, gastrit, ülser, mesane problemleri, böbrek taşı, bağırsak şikayetleri, düzensiz adet, hipertansiyon, romatizma gibi hastalıkların iyileştirilmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (20, 21). Tohum kısmının; infüzyon yatıştırıcı, göz kremi, ishal ve dizanteri veya çocuklarda bağırsak solucanı hastalıkların tedavisi için geleneksel kullanımı mevcuttur (Tablo 2.1). (21, 22).

*P. lanceolata*'nın içeriğinde bulunan bileşikler bitkiye antiinflamatuvar, antibakteriyel, antikanserojen vb. özellik göstermesini sağlamaktadır. Bitki içeriği flavonoidler, monoterpenoidler, triterpenoidler, iridoidglikozidler ve fenolik komponentler bakımından zengindir (10). *P. lanceolata* bitkisinin kimyasal içeriği Tablo 2.2' de verilmiştir.

**Tablo 0.1.** *P. lanceolata*'nın geleneksel tedavi amaçlı kullanımı (19).

GELENEKSEL KULLANIMI		
Deri	Yaralar	Kesikler, böcek ısırması, yanık
	Çürükler	Çürük, hemostatik
	Dermatozlar	Akne, eksantem, iltihaplı isilik, iltihap, Zona prurit, İnfeksiyonlar, parazitik infeksiyonlar,
Solunum yolu	İnfeksiyöz	Bronşit, Soğuk algınlığı, öksürük, Farenjit
	Alerjik	Astım
	İnflamatuvar	Diş eti iltihabı
Sindirim yolu	İnfeksiyöz	Ağız yaraları, stomatit; Mide ağrısı, gastrit, ülser, mide krampları, kolit, kabızlık, ishal, dizanteri
	Üroloji	İdrar taşı oluşumu, mesane patalojisi, enürezi
Ürogenital sistem	Jinekoloji	Dismenore, gebelik patolojileri
	Kardiyovasküler sistem	arteriyel hipertansiyon, ödem, hemoroid, diyabet
Çeşitli hastalıklar	Göz hastalıkları	Göz enfeksiyonları, analjezik olarak
	Parazitler	Antihelmintik, antimalarial
	Antisitres	Sinirsel şok
	Diğer	Antipiretik, halsizlik durumlarında uyarıcı, tümör, kırık iyileşmesi, yılan yaraları

**Tablo 2.2.** *P. lanceolata*'nın kütle spektrometresi ile elde edilen kimyasal bileşenleri (23).

Bileşen Adı	İşlenme Süresi (dk)	Fragmentör Voltajı (V)	Öncül İyonu (m/z)	Ürün İyonu (m/z)	Çarpışma Enerjisi (V)
Gallik asid	0.58	90	169	125	10
Kateşin	0.74	150	289	245	10
Protokatehuik asid	0.79	105	153	109	9
Khlorogenik asid	0.80	100	353	191	10
Epigalloateşin gallate	0.81	165	457	169	16
Epikateşin	0.95	150	289	245	10
2,5-Dihidroksibenzoik asid	1.03	100	153	109	9
p-Hidroksibenzoik asid	1.08	80	137	93	10
Aeskuletin	1.13	105	177	133	15
kaffeik asid	1.18	100	179	135	10
Vanillik asid	1.24	100	167	108	15
Syringic asid	1.31	90	197	182	7
p-Kumarik asid	1.69	90	163	119	9
Umbelliferone	1.73	120	161	133	19
Skopoletin	1.77	80	191	176	8
Ferulik asid	1.90	90	193	134	11
Viteksin	1.90	200	431	311	22
Sinapik asid	1.92	100	223	193	17
Luteolin-7-O-glukoside	2.13	230	447	285	30
Hiperokside	2.16	200	463	300	30
Quersetin-3-O-glukoside	2.25	210	463	300	30
Rutin	2.33	135	609	300	42
Apiin	2.60	250	563	269	36
o-Kumarik asid	2.62	100	163	119	5
Mirisetin	2.67	150	317	179	20
Quersitrin	2.75	190	447	300	27
Kaempferol-3-O-glukoside	2.80	190	447	284	30
Apigenin-7-O-glukoside	2.81	135	431	268	41
3,4-Dimethoxycinnamic acid	2.99	110	207	103	7

**Tablo 2.2.** *P. lanceolata*'nın kütle spektrometresi ile elde edilen kimyasal bileşenlerin devamı (23).

Baicalin	3.40	140	445	269	22
Daidzein	3.43	145	253	208	31
Matairesinol	3.66	130	357	122	24
Quesetin	3.74	130	301	151	15
Naringenin	3.87	130	271	151	16
Sinnamik asid	3.91	100	147	103	5
Luteolin	4.03	135	285	133	25
Genistein	4.12	145	269	133	32
Apigenin	4.71	130	269	117	25
Isorhamnetin	4.79	160	315	300	21
Krizeoriol	4.82	125	299	284	20
Baicalein	5.15	165	269	269	0
Amentoflavone	5.78	220	537	375	15

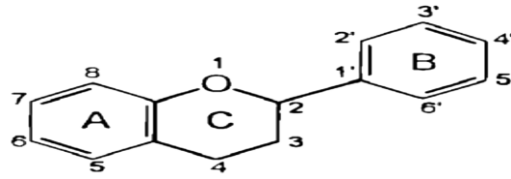
*P. lanceolata*'nın yaprak ekstratının wistar- albino farelerine *in vivo* olarak verildiği bir çalışmada karajenan üreterek ayaktaki ödemi %11 azalttığı rapor edilmiştir (24). Diğer bir çalışmada ise *in vitro* incelemede *P. lanceolata* yapraklarının doza bağlı olarak cox-2 aktivitesini azalttığını bildirilmiştir (25). Son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada ise *P. lanceolata* ekstraktlarının (40, 80, 160 mg/kg) farelerde cox-2 aktivitesini azaltarak pençe ödemi azalttığı ve böylece antiinflamatuvar etki gösterdiği ifade edilmiştir (26). Bu çalışmaların sonucunda *P. lanceolata* bileşenlerinden fenoloid asetosidler, plantomajosid, iridioglikosid ve aukubinlerin antiinflamatuvar etki oluşturmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (27).

Hayvan deneylerinde sulu ve metanolik ekstraktların karışımının (1,2 g/kg) gastrik ülser oluşumunu %40 oranında azalttığı belirlenmiştir (28). Başka bir çalışmada farelere *P. lanceolata* (140, 200, 280, 400 mg/kg) oral uygulanarak ülserlere karşı etkisi incelenmiştir. Doza bağlı olarak yüksek dozların düşük doza ve müsilaj oranına göre ülserlere karşı daha fazla koruduğunu ve yüksek dozların ülseri iyileştirdiğine dair sonuçlar elde edilmiştir (29).

*P. lanceolata*'nın HeLa, MCF7 ve HT-29 hücrelerine uygulanması sonucunda kanser hücrelerine karşı anti kanserojen etki gösterdiği de bildirilmiştir. Bu etkinin ise *P. lanceolata* içeriğindeki flavonoid bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (23).

## 2.2. Flavonoidler

Flavonoid, latince sarı anlamına gelen “flavus” kelimesinden türemiş iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propandır. Difenil propan (C6-C3-C6) yapısındaki bileşikler fenolik bileşik olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3) (30, 31). Flavon halkasında görülen iki bölgeden biri serbest radikallerin oluşumunda metallerin (bakır, demir) bağlanma bölgesini oluşturur diğer bölge ise nötralizasyonda görev almaktadır (32, 33). Flavonoidlerin iskelet yapısına göre çeşitleri Tablo 2.4’de verilmiştir.



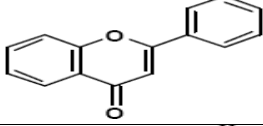
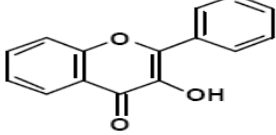
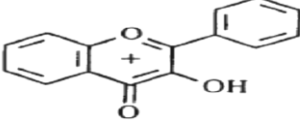
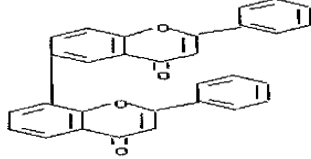
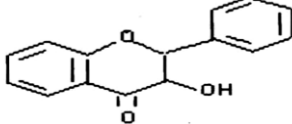
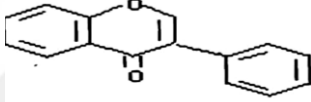
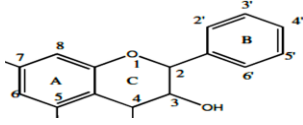
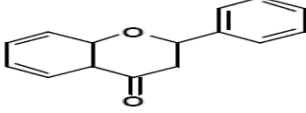
Şekil 2.3. Flavonoidlerin genel yapısı (34).

Flavonoidler; anti-oksidan, anti-hipertansif, anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-trombotik, anti-apoptotik ve antikanserojen özelliği göstermektedir (35). UV’ye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu için çoğu bitkiden elde edilen flavonoid bileşikleri, güneş kremleri içerisinde kullanılmaktadır (35, 36). Bitkilerin yaprak ve meyve kısımlarında fotosentez sonucu flavonoid oluşmaktadır. Kırmızı soğan, maydanoz, siyah ve yeşil çay, muz, yaban mersini, narenciyeler, kırmızı şarap ve çikolata vb. gıdalarda yüksek flavonoid içerir (31).

Hertog ve ark. tarafından yapılan çalışmada yaygın olarak tüketilen gıdalarda (sebze, meyve, çay vb.) bulunan flavonoidleri (quercetin, apifenin, myricetin, kaempferol ve luteolin) kullanan yaşlı kişilerde kronik kalp hastalıklarına bağlı ölüm riskinin azaldığı bildirilmiştir (37).

Bitkilerden izole edilen flavonoidlerin kanser hücrelerindeki çoklu kinazların fonksiyonlarını ve hücre sinyal aktarımlarını inhibe ettiği tümör hücre proliferasyonunu, invazyonunu, anjiyogenezini ve apoptozunu da engellediği bazı çalışma sonuçlarıyla desteklenmektedir (38-41). Antitümör özelliğinin ise; laktat transportunu ve kalmodulini inhibe ederek endoteliumundaki nitrik oksit (NO) sentezinin regülasyonunu etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mast hücresi ve histamin salınımını inhibe ettiği, lenfosit proliferasyonuna neden olurken oksidan salınımını baskıladığı ifade edilmiştir (42).

**Tablo 2.3.** Flavonoidlerin iskelet yapısına göre çeşitleri (34, 43).

FLOVONOİDLER			
İsimleri	Açık formülü	Bileşikler	
Flavonlar		Apigenin Chrysin Luteolin	
Flavonoller		Datisetin Quersetin Kaempferol Hesperdin	Dihidroquersetin Mirisetin Morin Rutin
Antosiyanidin		Siyanidin	
Biflavonoid		Amentoflovon	
Dihidroflavonoid		Taksifolin Slibin	
İsoflavon		Genistein Daidzein	
Flavan		Kateşin	
Flavanonlar		Naringenin Naringin	

İnal ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise ultraviyole A ışığına maruz bırakılan ratların karaciğer ve derilerinde MDA seviyelerinin arttığı, flavonoid bileşiğinden olan quercetin ile muamelesinde MDA seviyelerini azaltıp enzim aktivitelerini artırarak oksidatif stresi engellediği tespit edilmiştir (44). Yüksel ve ark insan lenfosit hücrelerinde mirisetinin estradiol-17 $\beta$  ile indüklenmiş DNA hasarını azalttığını çeşitli genotosisite testleri ile göstermişlerdir (45).

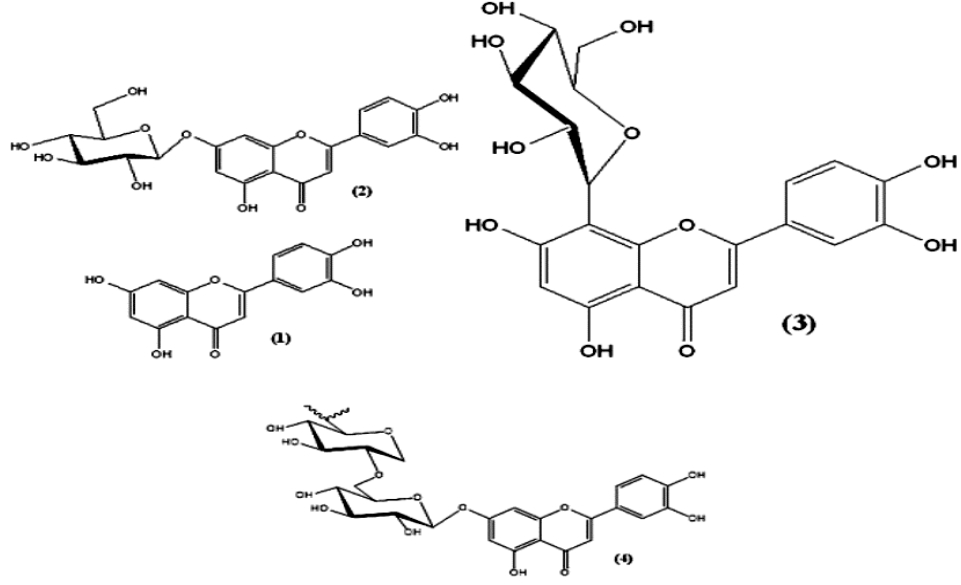
### 2.3. Luteolin

Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxy), bitkilerin yeşil kısımlarında bulunan bir flavondur. Luteolinin biyokimyasal ve biyolojik aktivitesinin görülmesi, yapısında bulunan hidroksil grupları ve 2-3 çift bağı yapısından kaynaklanmaktadır. Hidroksil grupları luteolinin karbonun 5, 7, 3' ve 4' pozisyonlarında bulunur (42, 46). Luteolin çoğunlukla glikozidlerle birleşerek glikozit formları oluşmaktadır (46, 47).

Luteolin ve glikozid formları havuç, karabiber, nane, kekik, zeytinyağı, adaçayı, biberiye, kereviz, yeşilbiber ve enginar gibi birçok bitkilerde doğal olarak bulunup diyet için kullanılmaktadır (Şekil 2.4) (48). Bunların dışında ağaç kabuğu, kekik, yonca çiçeği, karahindiba, papatya çayı, nane, meyve kabuğu ve portakalda da bulunmaktadır (49). Ortalama bir insanın, luteolin günlük tüketim miktarı 16 mg olarak belirlenmiştir (37, 50).

Luteolinin bir flavon türevidir olmasından kaynaklı olarak, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanserojen ve anti-angiyojen özellikleri gösterdiği çalışmalarıyla desteklenmektedir (48, 51). Luteolin içeren gıdaların tüketiminin, kronik hastalıklara yakalanma riskinin azalmasına neden olduğuna dair çalışmaları mevcuttur (52).

Luteolinin antioksidan etkisi ile ilgili araştırmalar da bulunmaktadır. Pei-Hu Liao ve ark. tarafından yapılan çalışmada antioksidan iskemi reperfüzyon (IR) hasarlı farelerin luteolin ile muamelesi sonucunda plazmadaki laktat, dehidrojen ve NO seviyelerinde azalma gözlemlendiği, bununla birlikte miyokardiyal enfarkt alanının küçüldüğü ifade edilmiştir (53). Yapılan bir diğer çalışmada ise luteolinin sıçan karaciğerinde MDA'yı azaltıp, SOD aktivitesini artırarak iskemi-reperfüzyon hasarını engellemiş olduğu rapor edilmiştir (54).

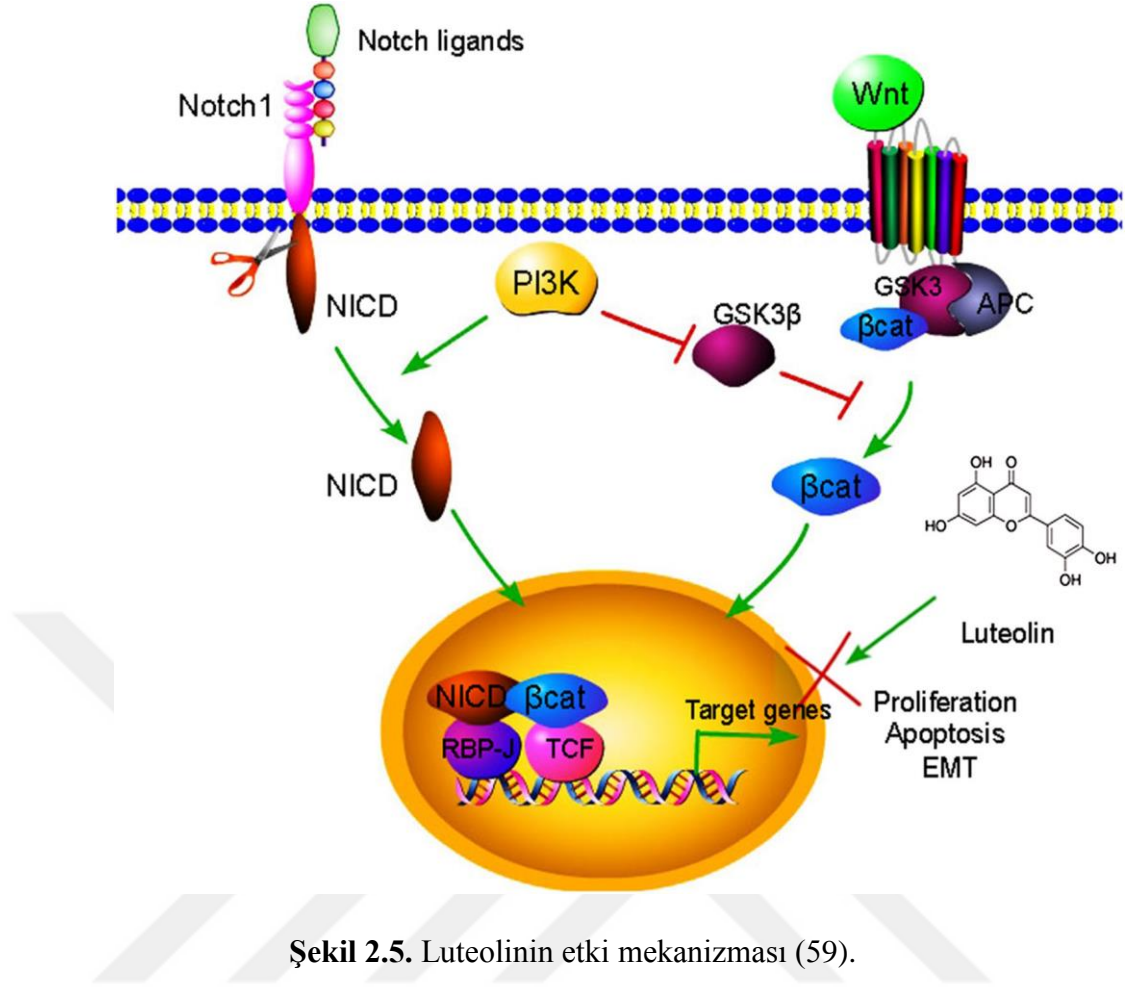


**Şekil 2.4.** Luteolin (1), luteolin 7-O-glukosid (2), luteolin-8-C<sub>1</sub>-β-D-glukopiranosid (3), luteolin-7-O-β -rutinosid (4) (55).

Zhu LH ve ark. tarafından nöron hücre kültüründe yapılmış çalışmada, luteolinin mikroglial inflamasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (56). Bir diğer çalışmada ise, luteolinin COX-2 gen inhibisyonu yaptığı ve kappaB transkripsiyonunu azaltarak sitokinlerin ( TNF, IL-1, IL-6, IL-8) salınımını engellediği belirtilmiştir (57). Luteolinin deneysel otoimmün tiroidit üzerindeki etkisi farelerde çalışılmış ve tiroid bezlerinde lenfositik infiltrasyonu ve folikül yıkımının azaldığı ayrıca luteolin STAT3'ün Tyr705 aktivasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmaların sonucunda luteolinin antiinflamatuvar etki sergilediği düşünülmektedir (58).

Luteolinin antiinflamatuvar etkisinin, antikanser etkisiyle ilişkili olduğu idda edilmiştir. Çeşitli kanser hücrelerinde luteolin apoptoz yollarını uyararak kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği çeşitli çalışma sonuçlarıyla desteklenmiştir (Şekil 2.5) (59). Luteolinin kan-beyin bariyerini geçebilmesinden dolayı beyin kanseri ve santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (60).





Şekil 2.5. Luteolinin etki mekanizması (59).

Kanserler, genellikle hücre bölünmesinin kontrolsüz olduğu durumlarda ortaya çıkar. Luteolin ise genellikle G1/S ya da G2/S kontrol noktasında kanser hücrelerinin bölünmesini inhibe ederek kanserin gelişimini durdurmaktadır (61-64). Yapılan çalışmalarda, luteolinin mide, prostat ve melanom hücrelerde G1 fazında hücre bölünmesini bloke ettiğine dair sonuçlar bildirilmiştir (64, 65). Bu durumun nedeni melanom OCM-1 ve kolon kanseri HT-29 hücrelerinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu durdurulmanın, CDK inhibitörleri p27/kip1 ve p21/waf1'nin up-regülasyonu ya da CDK2 aktivitesinde direkt inhibisyon ile gerçekleştiğini ve luteolinin bu etkisinin p53 aracılı p21/waf1'in ekspresyonuyla olduğunu ifade etmişlerdir (66, 67).

#### 2.4. DNA Hasarları ve Tamir Mekanizmaları

Bütün hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı mutajenlere maruziyet sonucu DNA hasarı meydana gelmektedir. Oluşan DNA hasarları hücrelerde erken yaşlanmaya ve kansere neden olmaktadır (68). Endojen ve ekzojen faktörler nedeniyle oluşan DNA hasarlarında, DNA hasarı yoğunluğuna göre hücresel yaşlanma, apoptoz, kanser, gen

ifadesinin değişmesi gibi olaylara neden olmaktadır. Bu nedenle hücreler genomik kararlılığı korumak için DNA tamir mekanizmaları geliştirmiştir. Bu tamir mekanizmaları doğrudan ve doğrudan olmayan DNA tamir mekanizması olarak 2'ye ayrılmaktadır (69, 70).

Doğrudan olmayan DNA tamir mekanizması; proof-reading ile onarım, kesip çıkarma ile onarım (baz kesip çıkarma ve nükleotid kesip çıkarma), çift zincir kırıklarının onarımı (homolog rekombinasyon ve homolog olmayan rekombinasyon ile onarım), yanlış eşleme onarımı ve SOS onarımı şeklinde sıralanabilir (70, 71).

Doğrudan DNA tamir mekanizması ise; fotoreaktivasyon ile onarım, O6-MGMT ile onarım, basit tek zincir kırıklarının onarımı şeklinde sıralanabilir (71, 72).

Genetik materyalde meydana gelen ani ve kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonlar meydana geldikleri hücre türlerine göre yavru bireylere aktarılabilir. Vücut (somatik) hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar yavru bireylere aktarılmaz. Somatik hücrelerdeki mutasyonlar kansere neden olabilir. Ancak üreme (gametik) hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar yavru bireylere aktarılabilir (72).

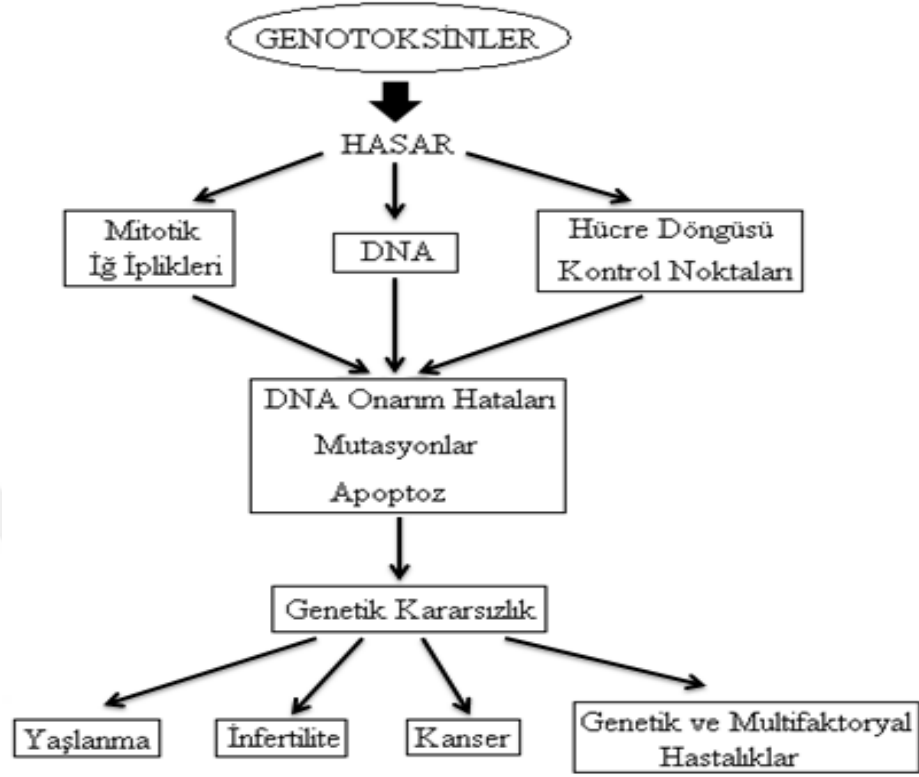
Sağlıklı bir insan hücresinde replikasyonda meydana gelen hata (DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi) oranı  $10^{-10}$ , hata okuma (proofreading) mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı  $10^{-8}$ 'dir (72).

## 2.5 Genotoksisite

Toksikoloji biliminin alt dalları arasında yer alan genetik toksikoloji ya da genotoksisite, canlının biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlerden kaynaklanan nedenlerden dolayı hücre DNA'sında meydana gelen değişiklikleri inceler ve çeşitli ajanların sebep olduğu genetik hasarın değerlendirilmesinde görev alır (73, 74).

Genotoksisite başka bir tanıma göre; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında herhangi bir DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöplöidi gibi hasarları çeşitli testlerle inceleyen bilimdir. DNA'da hasar meydana getirmesine veya değişimlere yol açmasına ise genotoksik etki denilmektedir (Şekil 2.6) (73, 75, 76). Kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin değerlendirilmesinde endüstri kuruluşları tarafından genotoksisite testlerinin

kullanılmasına neden olmuştur (77,78). Genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmakta olup *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır (79).



Şekil 2.6. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (80, 81).

Genotoksisite testleri; UV, irradyasyon, parazitik enfeksiyonlar, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik etkisinin saptanmasında, ilaçların ve ilacı kullanan kişilerdeki genetik etkilerini araştırmada, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunma, kansere duyarlılığın belirlenmesinde kullanılmaktadır (12, 79, 82).

### Genotoksisite Testleri

#### Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozomal anormallikler; kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal düzensizlikleri içerir. Sayısal anomaliler genellikle mayotik veya mitotik bölünme sırasında kromozom veya kromatid ayrılması sırasında oluşan hatalardan kaynaklanırken yapısal anomaliler mutajenlerin DNA'da yaptıkları tek veya çift zincir kırıkları sonucu oluşan yeni kromozomal oluşumları kapsamaktadır. DNA'daki onarılmamış veya yanlış

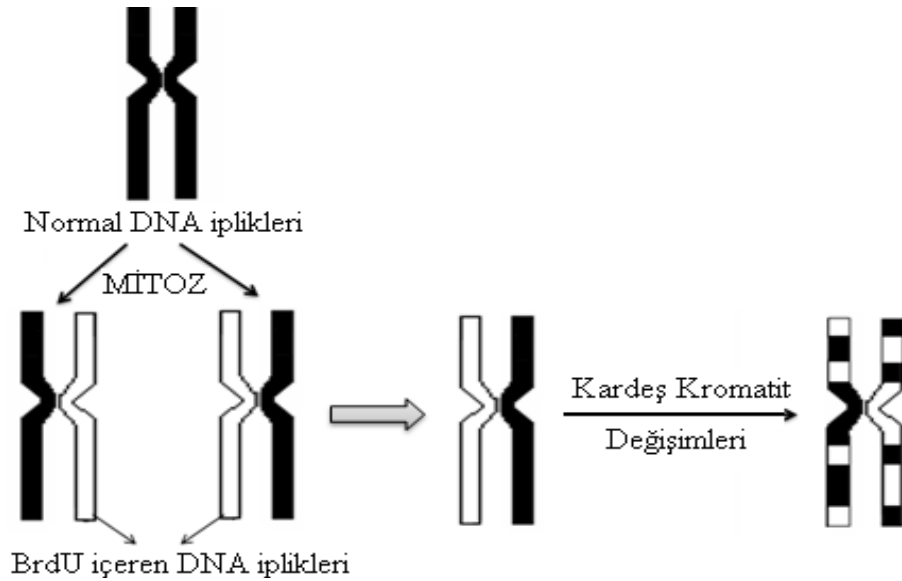
onarılmış çift zincir kırıkları nedeniyle KA ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle hasarlar tamir edilemediği için KA seviyesi artış gösterir bu da kanser riskini arttırmaktadır (83- 85).

KA testi, çeşitli mutajenlerin neden olduğu yapısal ve sayısal kromozomal anomalliklerin belirlenebilmesi için standart olarak kullanılan testir (74, 85).

### **Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi**

Kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasında değişime KKD denir. Bu test nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile bağlantılıdır (86, 87). Mutajen ve karsinojenin hücrelerde neden olduğu kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD artması ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişki olduğu bilinmektedir (38, 56, 88, 89).

KKD testinde, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesi hücre kültürlerine eklenmektedir ve bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlardaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi gösterilmektedir. DNA'ların replikasyonu sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri geçmektedir. Bu da ultraviyoleye maruz kalmasıyla bir kolun diğerine göre daha açık olduğu görülür. DNA içine yerleşmiş olan BrdU daha açık renkte boyanmış bölgelerdir ve bu boyama farkıyla DNA'da kardeş kromatitler arasında oluşan değişimler gözlenebilmektedir (Şekil 2.7) (37, 54, 82, 90).

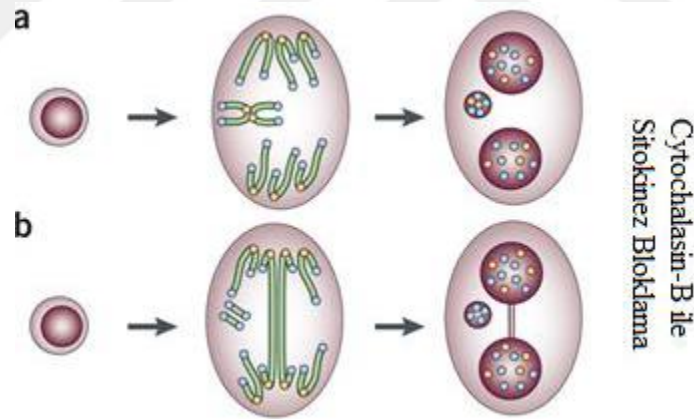


**Şekil 2.7.** BrdU ile kardeş kromatit değişiminin belirlenmesi (91).

## Mikronükleus (MN) Testi

MN'ler hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanabilir. Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu mitoz bölünme esnasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozomal fragmanların çekirdeğe benzer oluşum göstermeleri sonucu ortaya çıkan hücrede birden fazla çekirdek yapısının görülmesine neden olur. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Çeşitli hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen MN görülme sıklığının yüksek olduğu bulunmuştur (92-94). MN testi, genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir testir (95).

*In vitro* MN testinde, hücre kültürlerinde ilk mitozdan önce kültüre sitokalsin-B maddesi eklenir. Bu madde sitokinezi durdurarak hücrenin binükleer oluşmasına neden olur (Şekil 2.8) (96, 97).



**Şekil 2.8.** Mikronükleus oluşumu a) Anafazda geri kalan kromozomların oluşturduğu MN b) Asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan MN, ve sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu (98).

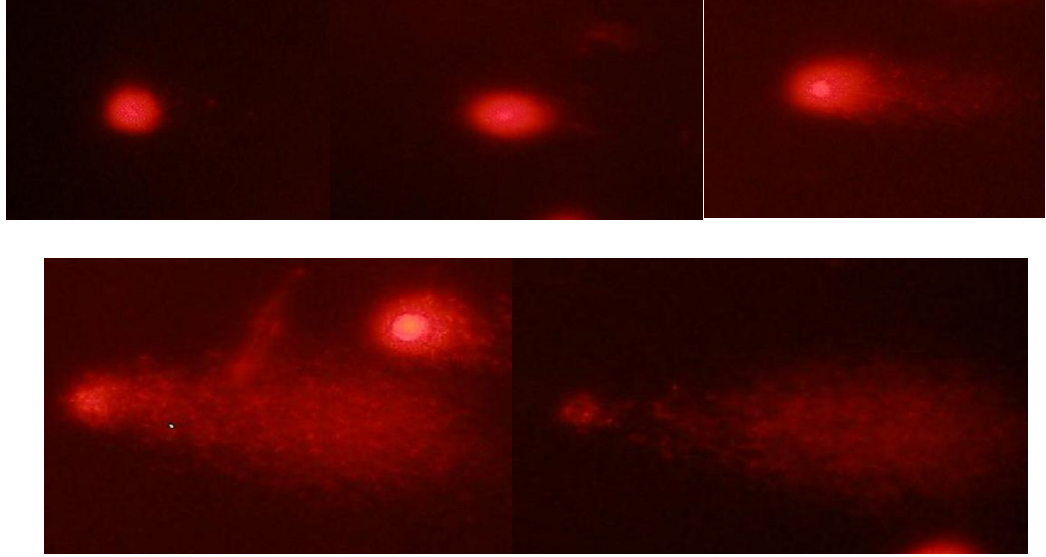
## Komet Testi

Komet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da bilinmektedir. DNA kırıklarını belirlemeye

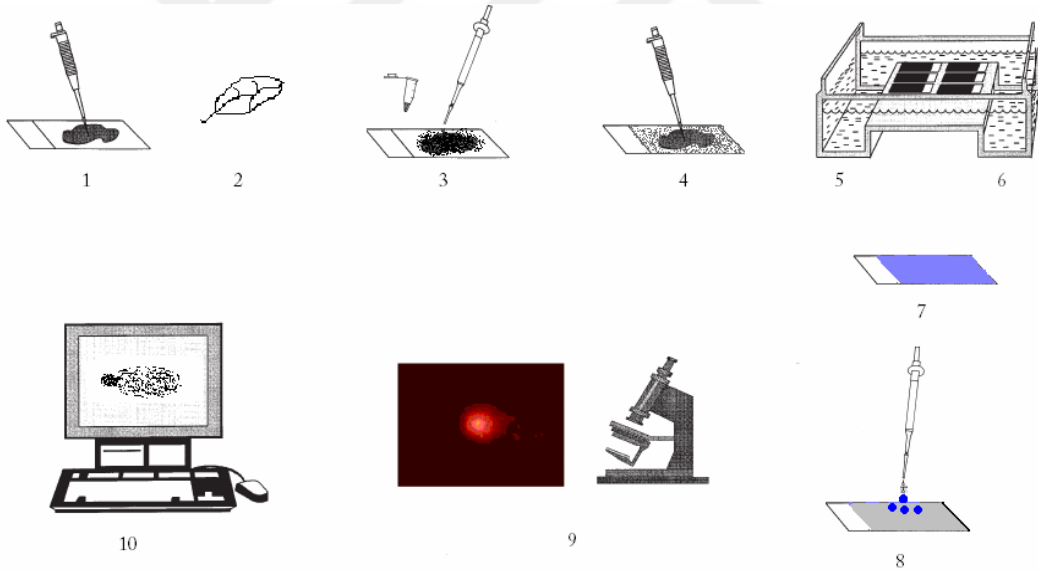
dayanan bu yöntem, mutajenlerin neden olduğu DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir testtir. Düşük hasarı bile ölçebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, hızlı, basit ve ucuz olması nedeniyle tercih edilmektedir (72, 99, 100).

İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmekteydi. Singh ve ark. tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Singh ve ark. komet yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlaması, *in-vivo/in-vitro* olarak uygulanabilmesidir (100, 101).

Komet yönteminde, hücreler veya çekirdekler öncelikle agaroz jel tabakaları arasına yerleştirilip lizis solüsyonu ile DNA açığa çıkartıldıktan sonra elektroforez tamponunda yürütülür ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanıp DNA'da oluşan hasarlar tespit edilir. Zarar görmemiş DNA'lar, komet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarından dolayı farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç ederek kuyruk oluşumu izlenim verdiği için kuyruklu yıldız görünümüne benzetilmektedir (Şekil 2.9) bu nedenle bu tekniğe "Komet" adı verilir. Komet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde, kuyruk uzunluğu, kuyruk momentleri ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir. Komet tekniği DNA hasarını izlemede uygun ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bireyin, DNA onarım kapasitesini belirlemek içinde komet tekniğinden yararlanılmaktadır. Hasarlı DNA'nın onarılmaması kanser oluşumunun temel mekanizması olarak kabul edilir. Bu olay DNA onarım yetersizliğini ve kansere yatkınlığı dolayısıyla bireysel duyarlılığı da belgeler. (Şekil 2.10) (89, 101, 102).



**Şekil 2.9.** Komet yöntemi ile farklı seviyelerdeki DNA hasarları a) Hasarsız; b) Çok az hasarlanmış DNA; c) Az hasarlanmış DNA; d) Hasarlanmış DNA; e) Tümüyle hasarlanmış DNA (103).



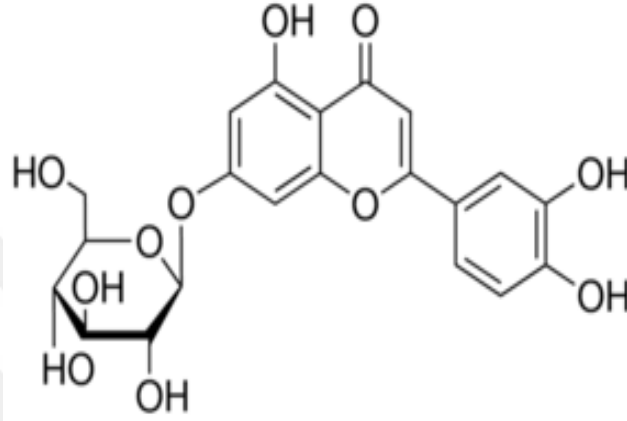
**Şekil 2.10.** Komet analiz çalışmasının aşamaları; (1) %1' lik HMA Agarozun hazırlanması, (2) Test maddesinden DNA izolasyonu yapılması (3) 1:1 oranında hücre karışımı ile %1' lik LMA karışımının HMA agaroz kaplı lamın üzerine eklenmesi (4) HMA ve hücre ile karışık LMA ile preperat, (5) Elektroferez tanponunda DNA gevşemesi için soğuk ortamda bekletilmesi, (6) Elektrik akımı altında elektroferez uygulaması, (7) Preparatların en az üç kez nötralizasyon solüsyonunda yıkanması, (8) 100µl Ethidium bromid ile (20 µg/ml-1) ile boyanması, (9) Floresan mikroskopta görüntülenmesi, (10) DNA hasarı görsel analiz edilmesi (104).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Araçlar

##### Luteolin-7-β-D glucoside

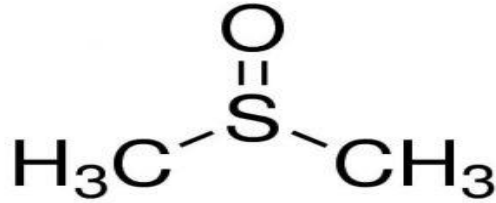
DNA hasarına karşı koruyucu ajan olarak kullanılan bir flavonoid türüdür. Bu çalışmada Sigma-Aldrich Luteolin-7-β-D glucoside (74284-1MG) kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Luteolin-7-β-D glucoside'nin açık formülü (105).

##### Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

DMSO (PanReac AppliChem, A3672,0250), luteolinin çözünmesi ve komet lizis solüsyonunun hazırlanmasında kullanıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. DMSO'nun açık formülü (106).



### **Kromozom Medyumu**

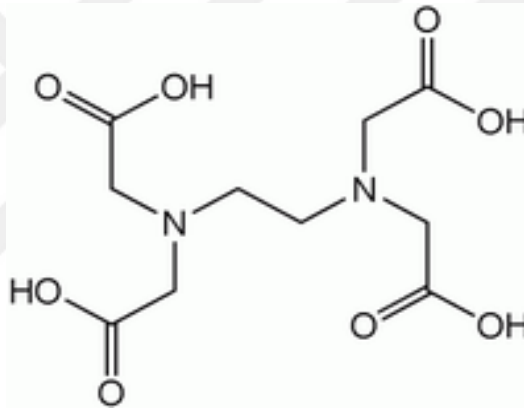
Hücrelerin canlılık faaliyetlerini sürdürmeleri için steril kültür kaplarına test türlerine göre uygun miktarda Chromosome Medium P (EuroClone EKAMTSY20) konuldu.

### **Senkronizasyon kiti**

Hücrelerin senkronize bir şekilde bölünmelerini sağlamak amacıyla Chromosome Synchro M (EuroClone, EKAMTSY20) kullanıldı.

### **EDTA (Ethylenedinitriletetraacetic Acid)**

Komet lizis solüsyonunda  $Ca^{+2}$  iyonlarını tutarak hücre DNA'sını nükleazlara karşı korur. Bu çalışmada PanReac AppliChem EDTA (A5937,0500) kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. EDTA'nın açık formülü (107).

### **NaOH (Sodium Hydroxide)**

Komet lizis solüsyonunda ve elektroforez solüsyonlarında pH ayarlamak için NaOH (PanReac AppliChem, A3910,1000) kullanıldı.

### **Triton X-100**

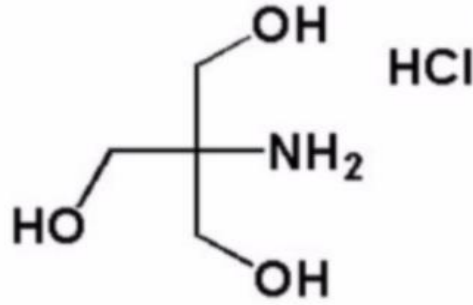
Hücre zarı ve çekirdek zarının parçalanması için kullanılan bir tür deterjan olan Triton X-100 (ThermoFisher Scientific, 28313) kullanıldı.

### **Trizma Base**

İzole edilen DNA'nın pürüfikasyonu ve izolasyonu için Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503) kullanıldı.

### Tris-HCl (Tris-Hydrochloride)

DNA ve RNA moleküllerinin izolasyon sonrası kalitelerinin artırılması için Tris-HCl (Fisher Scientific, BP153-500) kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tris-hidroklorid`nin açık formülü (108).

### High Melting Agarose (HMA)

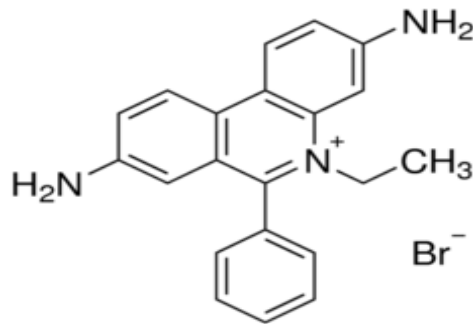
Lam üzerinde hücrelerin tutunacağı yüzeyi oluşturabilmek için agaroz (Thermo Scientific, 17850) kullanıldı.

### Low Melting Agarose (LMA)

Hücrelerin lam yüzeyinde ince bir tabaka şeklinde durması için (Acros Organics, AC400410250) LMA kullanıldı.

### Ethidium Bromide (EtBr)

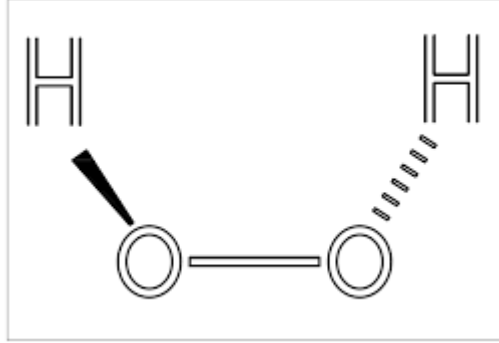
DNA zincirindeki bazların arasına yerleşerek DNA'nın görünmesini sağlayan bir tür floresan boyadır. Bu çalışmada EtBr (Sigma-Aldrich, 1239-45-8) kullanıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. EtBr`nin açık formülü (109).

### **Hydrogene Perokside (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hücre DNA'sında kırık oluşturmak için kullanılan mutajendir. Bu çalışmada %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ChemSolute, 437.1011) kullanıldı (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** Hidrojen peroksite kimyasal yapısı (110).

### **Colcemid**

Hücrelerin metafaz aşamasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek kromozomları elde etmek için Biological Industries Colcemid (12-004-1D) kullanıldı.

### **Histopaque 1077**

Tam kandan gradiyent farkı yardımıyla lenfositlerin ayrılması için Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, 10771-100ML) kullanıldı.

### **Monopotassium Phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)**

Kardeş Kromatit değişimi Testinde boyama sırasında iyon verici olarak KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, 7778-77-0) kullanıldı.

### **Potassium Chloride (KCl)**

KCl (Merc, 747-40-7) KKD testinde boyama sırasında iyon verici ve histon oktomerlerinin kristal yapı almasını sağlamak için kullanıldı.

### **Giemsa**

Giemsa (Merc, 67-56-1) KKD testinde kromozomların boyanmasında kullanıldı.

### **Distile Su Cihazı**

Suyun kontaminasyondan arındırılması için Merc dH<sub>2</sub>O cihazı kullanıldı.

## Hücre Kültürü Ekipmanları

Hücre kültürünün oluşturulması ve kültür sürecinde CO<sub>2</sub>'li inkübatör (NÜVE, EN 120), laminer air kabin (PSCO), inverted mikroskop (BAB BS 200 PRO), otomatik pipetler (Thermo Scientific), hassas terazi (OHAUS), santrifüj (NÜVE, NF800R) kullanıldı.

## Bitki materyali

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından tanımlanmış olan *P. lanceolata* bitkisinin İnönü Üniversitesi kampüsünden Mayıs-Haziran aylarında 2018 tarihinde toplanmıştır. *P. lanceolata* 8057-2019 numarası ile İnönü herbaryumunda muhafaza edilmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Tanımlanmış olan *P. lanceolata*.

## 3.2. Çalışmada Kullanılan Metodlar

### Bitki ekstratının hazırlanması

*P. Lanceolata* örneklerinin ekstraktı hazırlanırken diğer çözücülere göre düşük karsinojenik etkisi, geniş kullanım alanı ve kimyasal bileşenleri kolayca çıkardığı

için methanol kullanıldı. 10 gr kuru bitki kısımları 100 ml methanolde 1 gece bekleyerek çözüldü. Daha sonra methanollü bitki karışımı filter kağıdı ile süzülde. Methanol buharlaştırıp uzaklaştırılarak bitki ekstratı hazırlandı (Şekil 3.8).



Şekili 3.8. A; *P. lanceolata*'nın 40 g kurutulmuş yaprakları, B; *P. lanceolata*'nın 40 g kurutulmuş yaprakların 400 ml'lik methanolle karışımı.

#### ***P. lanceolata* ve Luteolin-7- $\beta$ -D'nin (LDG) Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

*P. lanceolata* ve LDG dozunun belirlenmesinde daha önce yapılmış olan çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur. Bunun için yapılan literatür çalışmasında Harutyunyan K. ve ark. tarafından yapılan çalışmada kullanmış oldukları MN testindeki *P. lanceolata*'nın 100, 200, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonları referans olarak alınmıştır (111). LDG için ise Zang M. ve ark. yapmış oldukları çalışmada 0, 10, 20, 30  $\mu\text{M}$  kullanmış oldukları konsantrasyonlar referans olarak alınmıştır (59).

#### **Çalışma planı**

Yaptığımız çalışmada çeşitli genotoksisite parametreleri kullanıldı. Çalışmada hiçbir kimyasala maruz kalmamış bir negatif kontrol grubu, pozitif kontrol olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanıldı. Deney grubu olarak *P. lanceolata* özütünden 200 ve 500  $\mu\text{g/ml}$ , luteolin için 10, 20, 30  $\mu\text{M}$ 'lık dozlar 24 saatlik uygulamalarda kullanıldı. Ek olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile *P. lanceolata*'nın 200 ve 500  $\mu\text{g/ml}$  ile luteolin'in 10, 20, 30  $\mu\text{M}$  dozlarıyla kombine grupların uygulanmasıyla toplamda 6 gruptan oluşturularak çalışıldı. KKD testinde ise 6 grup oluşturuldu bu gruplar kontrol grubu ve *P. lanceolata*'nın 200 ve 500 $\mu\text{g/ml}$  ile luteolin'nin 10, 20 ve 30 $\mu\text{M}$  dozlarından oluşmaktadır.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan gruplar.

Gruplar	KOMET		KKD
	Lenfosit	HepG2	Lenfosit
Kontrol	+	+	+
Pozitif kontrol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	Siklofosamid 160 ng/ml
<i>P. lanceolata</i> (µg/ml)	200 500	200 500	200 500
LDG (µM)	10 20 30	10 20 30	10 20 30
<i>P. lanceolata</i> +	200	200	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (200 µM)	500	500	
LDG +	10	10	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (200 µM)	20 30	20 30	

### **KKD Testinin Preperatlarının Hazırlanması**

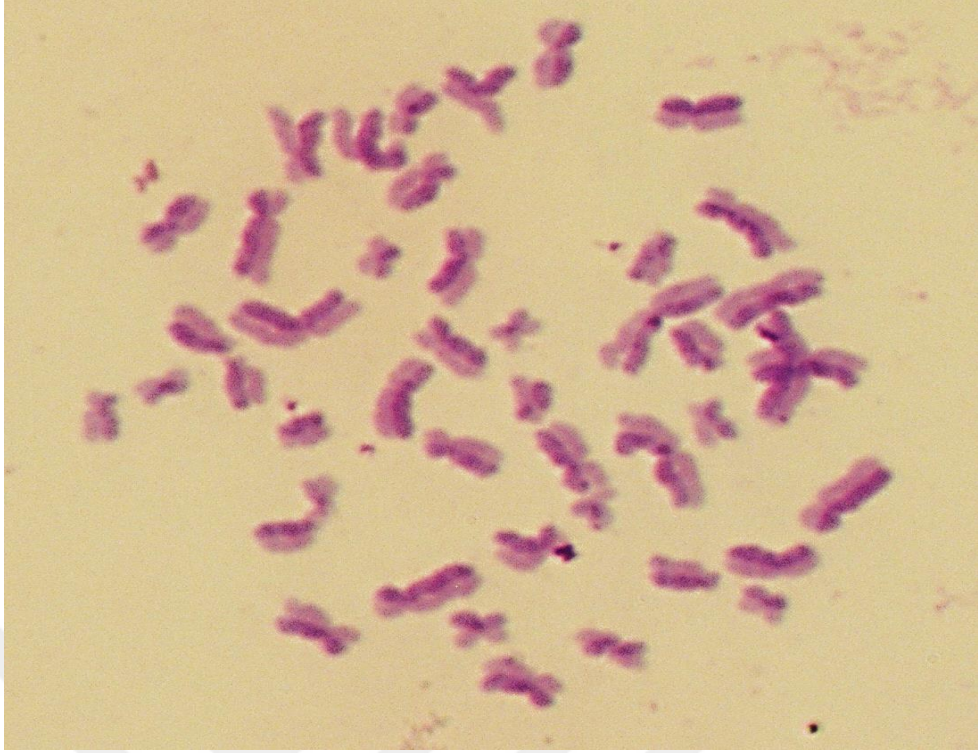
Çalışmamız Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2018/156 nolu kararı ile onaylanmıştır. Buna göre çalışmada kalıtsal hastalık öyküsü, kronik metabolik hastalığı ve kanser riski olmayan, sigara içmeyen, 25-30 yaş arası, sağlıklı iki gönüllü donörden 5 ml heparinize edilmiş kan örnekleri alındı ve kültür medyumlarına steril olarak 0.4 ml olacak şekilde ekildi. Kültür tüplerine *P. lanceolata*'nın 200 ve 500 µg/ml ile LDG 10, 20 ve 30 µM konsantrasyonları eklendi her bir tüp için BrdU eriyiği son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde ilave edildi ve tüpleri kültür etmek için etüvde 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı (112). Tüplere kültürün 44. saatinde A senkronizasyon kiti, 64. saatinde B senkronizasyon kiti, 71. saatinde ise kolçisin eklendi. Hücreler 1 saat süresince 37 °C'de kolçisin ile muamele edildi.

Kültür sonunda KKD harvest işlemleri uygulanarak preparatlar hazırlandı. Kültür süresi bitiminde kültür tüpleri 1000 rpm`de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Santrifüj nedeniyle dibe çöken hücrelere KCl 0.56 mg 100 ml dH<sub>2</sub>O da eritilerek hazırlanan hipotonik solüsyonu vorteks yardımıyla damla damla 7 ml olana kadar ilave edilip, etüvde 37 °C`de 50 dk inkübe edildi. Daha sonra tüpler 10 dk 1000 rpm`de santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hipotonik solüsyonun eklendiği şekilde vorteks yardımıyla tüplere damla damla 7 ml olana kadar 300 ml metanol, 100 ml asetik asit olarak 3`e 1 oranında hazırlanmış fiksatif solüsyonu soğuk olarak ilave edildi. Hücreler 1000 rpm`de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı ve tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Fiksatif işlemi sıvı ile karışık hücreler berraklaşana kadar devam edildi. Toplam olarak 3 kez fiksatif işlemi yapıldı. Son fiksatiften sonra hücreler fiksatif solüsyonu içinde bir gece +4°C`de bekletildi. Preperat yapma işlemi için +4°C`de bekletilen fiksatif içerisindeki hücreler 1000 rpm`de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Falcon içerisinde kalan hücreler pipetaj yapılarak yayma işlemine hazır hale getirildi. Lamlar daha önceden temizlenerek 5 dk -20°C`de bekletildi. Pasteur pipet yardımıyla hücreler -20°C`de bekletilmiş lamlara 50-75 cm yükseklikten farklı alanlara 4-5 damla olacak şekilde damlatılarak yayma işlemi yapıldı. Hücrelerin, lamlara damlatılmasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilerek yapıldı. Hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (112).

### **KKD Preparatlarının Boyanması**

Hazırlanmış olan preparatlar 2 saat 90°C bekletilerek yaşlandırmaya bırakıldı. Yaşlandırmanın ardından kromozomların kardeş kromatidlerinin farklı boyanmasını için ışınlandırma solüsyonu içerisine preparatlar konulup karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W`lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile 50 dk ışınlandırma yapıldı. Işınlandırma solüsyonu için; 5 ml tampon A, 5 ml tampon B`den alınıp bu karışım 100 ml`ye tamamlanacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenerek pH`ı 6.8 olacak şekilde hazırlandı. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk inkübe edildi (113, 114). Boyanmaya hazır olan preparatlar, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml giemsa karıştırılarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml tamamlanıp filtre kağıtından süzülerek hazırlanan boya solüsyonu içerisinde 25 dk bekletildi. Daha sonra preparatlar 3 kere dH<sub>2</sub>O da bekletildi ve fazla boyanın akması sağlandı. Preperatlar dik bir şekilde konularak preparatları kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılıp mikroskop incelemeleri yapıldı (Şekil 3.9) (87, 114).





**Şekil 3.9.** KKD`nin boyama sonucundaki görüntüsü.

### **Lenfosit İzolasyonu**

İki sağlıklı donörden lityum heparinli tüplere alınan kan örnekleri PBS ile karıştırıldı. Lenfositler histopaq 1077 gradient izolasyon yöntemine göre ayrıştırıldı. 15ml`lik falkonun içerisine 5 ml Histopaq eklenip üzerine PBS ile karıştırılmış kan eklenerek 2600 rpm de 20 dk santrifüj yapılarak plazma, lenfosit ve eritrositler birbirlerinden ayrıldı. Lenfosit ve plazma 15ml`lik falkona alınıp 1800 rpm de 10 dk santrifüj edilip plazma uzaklaştırıldı. Falkon içerisindeki lenfosit 5ml NH<sub>4</sub>Cl eklenerek 5 dk bekletilerek 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve süpernetant kısmı atıldı. Lenfositler 3 ml PBS ile karıştırılıp 1000 rpm de 3 dk santrifüj edilerek yıkama yapıldı (115).

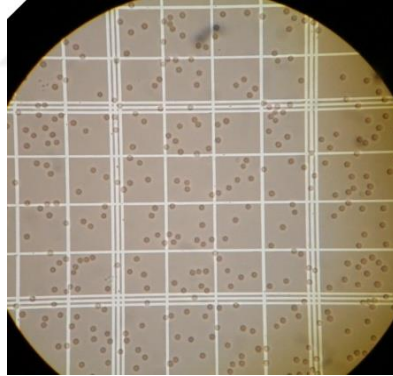




**Şekil 3.10.** Lenfosit izolasyonu aşaması görüntüsü.

Hücre canlılık oranını belirlemek için elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µL bir ependorf tüpe aktarılarak üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0.4 a/h) eklenerek iyice karıştırıldı (Dilüsyon faktör: 10). Yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu Tripan mavisi karışımı thoma sayım lamına uygulandı.

Hücre canlılık oranı % 90`nın üstünde olduğu durumlarda deneylere başlandı.



**Şekil 3.11.** Lenfosit hücrelerinin thoma lamında görünümü.

Canlın hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül 3.1. kullanıldı.

$$ml'deki canlı hücre sayısı = Toplam hücre sayısı 4 \times 10,000 \times 10$$

### **HepG2 Hücre Kültürü**

İnsan hepatocellular kanser hücre hattı olan HepG2 kullanıldı. HepG2 hücresi (DMEM) medium içerisinde büyüme sağlandı. DMEM içerisinde, düşük glikoz ile L-Glutamin, sodium pürüvat, HEPES bulunmaktadır. DMEM büyüme faktörü ve protein

içermeyen bazal bir hücre kültür besisi ortamı olduğundan ek olarak % 5-10 fetal bovine serum (FBS) ve % 1 Pen-Strep solüsyonu eklendi. -80°C’ de saklanan HepG2 hücrelerini pasajlamak için 1 gece -20°C’de bekletildi. Daha sonra +4°C’de kısa süreliğine bekletilerek hücrelerin şoka girmesi engellendi. Medium içerisinde olan HepG2 hücrelerinin mediumdan uzaklaştırılıp yeni medium eklenerek hücreler 5ml flask içerisine alındı ve 2 gün boyunca hücreler 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> atm sahip inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flask içerisindeki hücreler ışık mikroskobu altında incelenerek hücrelerin çoğalmasına bakıldı.

Flask tabanına tutunan hücreler yeterli koloni oluşturduğu zaman biyo-güvenlik kabininde medyum uzaklaştırılıp içerisine 1ml tripsin- EDTA eklendi ve 5 dk bekletildi. Hücreler pipetajla kaldırılıp 15ml falkon içerisine alındı. Falkon içerisindeki hücreler 1000 rpm de 6 dk oda ısısında santrüfuj edilip Tripsin-EDTA uzaklaştırıldı. Hücreler süspansiyonuna iki kez yıkama işlemi yapıldı. Elde edilen hücrelerin dörtte biri alınıp 6’lık well plaklara eşit bir şekilde dağıtıldı ve üzerine 3 ml tamamlayacak şekilde DMEM eklendi. 37°C de %5 CO<sub>2</sub> atm’li etüvde 2 gün inkübe edildi. Hücrelerin canlılık oranı % 0,4 tripan mavisi kullanılarak belirlendi ve canlılık oranının % 90’ın üstünde olduğu durumlarda deneylere başlandı.

HepG2 hücrelerinde kültürün ikinci gününde *P. Lanceolata* için 200 ve 500 µg/ml ve LDG için ise 10, 20, 30µM konsantrasyonları eklenip 24 saat 37°C’de 5% CO<sub>2</sub> atm’li etüvde bekletildi. Pozitif ve kombine gruplar için ise 200 µM’lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.

*P. lanceolata* ve luteolin ile 24 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerin bulunduğu plaklardaki DMEM steril pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Plaklara 0.6 ml Tripsin- EDTA eklenip 4-5 dk beklendi. Daha sonra serbest kalan hücreler pipetaj yapılarak 15 ml falkonlara alınıp 1000 rpm de 6 dk oda ısısında santrüfuj edildi ve tripsin-EDTA’dan uzaklaştırıldı. Daha sonra HepG2 hücreleri yıkayıp genotoksisite testleri için hazır hale getirildi (116).

### **Komet Solüsyonlarının Hazırlanması**

**Lizis solüsyonu:** 7.45 gr EDTA, 14.6gr NaCl, 0.12 gr trisma-base 100 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü. NaOH ile EDTA’nın çözünmesi sağlandı. Hazırlanan stoktan çalışmaya başlamadan önce 1ml %1’lik triton X-100 ile 10 ml DMSO eklenerek pH: 10 olacak şekilde 100 ml total solüsyon hacmi oluşturuldu. Lizis solüsyonu +4°C de soğutulmuş olarak kullanıldı.

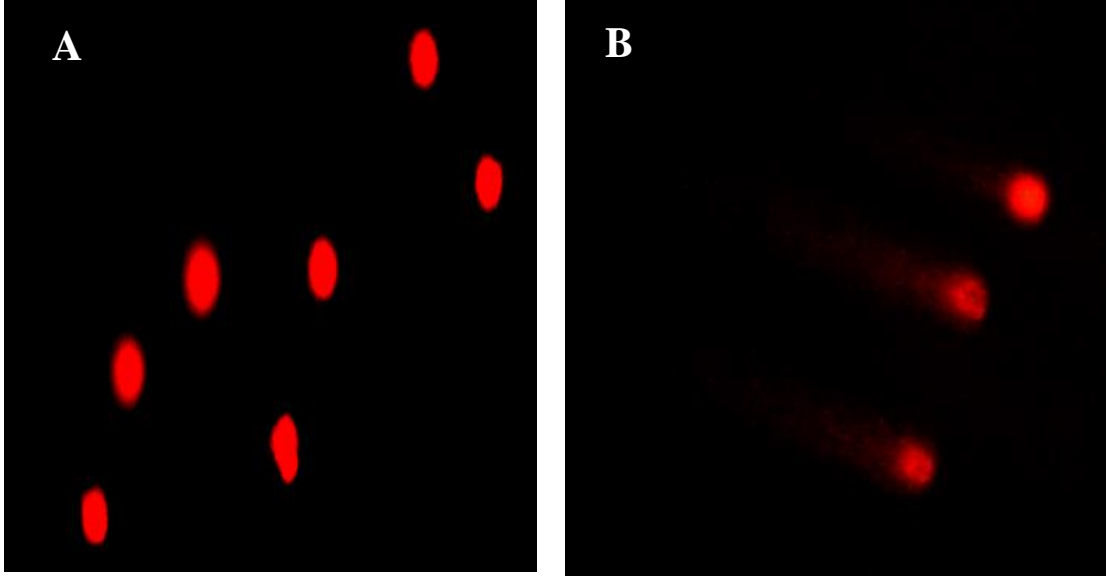
**Elektroforez solüsyonu:** 0.292gr EDTA, 12gr NaOH üzerine 1000ml dH<sub>2</sub>O eklenerek çözüldü. pH: 13 ve üzeri kullanıldı.

**Nötralizasyon solüsyonu:** 4.85gr tris 100ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. pH 7.5 olacak şekilde kullanıldı.

### **Komet Testi**

Lenfosit izalasyonu ile elde edilen lenfositler, 15ml'lik falkon tüplerine 3ml'lik kromozom medium-P eklenerek 24 saat 37 °C de etüv içerisinde inkübe edildi. Yapmış olduğumuz çalışmada, kültür hücrelerine *P. lanceolata* için 200 ve 500 µg/ml ve LDG için ise 10, 20 ve 30 µM konsantrasyonları uygulandı. Belirlenen konsantrasyonlar 15ml falkonlara inkübasyonun başlamasıyla eklendi. Pozitif kontrol ile birlikte uygulanan kombine gruplar için lenfositler 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile buz üzerinde 10 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası falkon tüpleri 1000 rpm de 10 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Falkon içerisine 0,5 ml'lik medium eklenip pipetaj yapıldı. % 1'lik NMA 1gr'lık agarozu 100 ml'lik PBS içerisinde çözüldü. Çözünmüş olan NMA içerisine lamalar batırılıp çıkartılarak dik bir şekilde kurumaları beklenildi. % 0.5'lik LMA için 10 mg agaroz 2 ml PBS'de çözüldü. Her preparat için 15-20 µL falkon içerisindeki lenfosit hücreleri alınarak 75 µL, 37 °C'deki LMA ile karıştırılıp önceden hazırlanan NMA'lı lamlara 60µL eklenerek lamel ile yayılıp jelin donması beklenildi. Donan jeller üzerinden lamel kaldırılıp hazırlanan lizis solüsyonunda preparatlar 1 saat boyunca +4 °C'de bekletildi. 1 saat sonra lamalar lizis solüsyonundan çıkarılıp DNA sarmalının çözülmesi için elektroforez tamponunda 20 dk +4°C'de bekletildi. 300 mA ve 25 V'da 25 dk elektroforeze maruz bırakıldı. Elektroforez işleminin bitmesinin ardından preparatlar çıkarılıp +4°C'de bekleyen nötralizasyon solüsyonunda 5'er dk aralıklar ile 3 kez yıkama yapıldı. Preparatların daha temiz olması için etil alkol içerisinde 3 dk bekletildi.

Boyama için 1 mg etidyum-bromür 5 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Hazırlanan stoktan 100 µL alınıp üzerine 900 µL dH<sub>2</sub>O ile seyreltilip jeller üzerine 50 µL eklenip lamelle kapatıldı. Boyanmış lamalar karanlık ortamda floresan mikroskopunda incelendi ve 40'luk objektifte fotoğraflanarak skorlandı. Çalışmamızda her donör için 50 hücre BAB-BS 200 PRO analiz programı ile analizleri yapıldı (117, 118).



**Şekil 3.12.** Floresan mikroskobunda KOMET görüntüsü A) Hasarsız DNA, B) Hasarlı DNA görüntüsü.

Hasar sonucu oluşan DNA'lar komet testinde toplam DNA (DNA<sub>C</sub>), baş ve kuyruk olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Baş kısmındaki DNA yüzdesi (% H-DNA) ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi (% T-DNA), kuyruk uzunluğu (TL) ve Tail Moment (TM) gibi parametreleri incelenerek komet değerlendirilir (118, 119). Ortalama kuyruk DNA'sı şu şekilde hesaplanır;

$$DNA_C = DNA_H + DNA_T$$

$$\%DNA_T = 100 \times DNA_T / DNA_C$$

Tail momentumunun hesaplanması ise şu şekildedir;

$$\text{Tail momentum} = \%DNA_T \times TL / 100$$

Yaptığımız çalışmadaki komet testinde ise %T-DNA ve Tail Moment parametreleri incelenerek yorumlanmıştır.

### **İstatistiksel Analiz**

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KKD ve komet parametrelerine ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Veriler ortanca, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. Grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis varyans analizi ve sonunda Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler Windows for SPSS Version 16.0 yazılım programında yapıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi  $P \leq 0.05$  olarak kabul edildi.

Mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge halinde verilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. *P. lanceolata*'nın ve LDG'nin Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

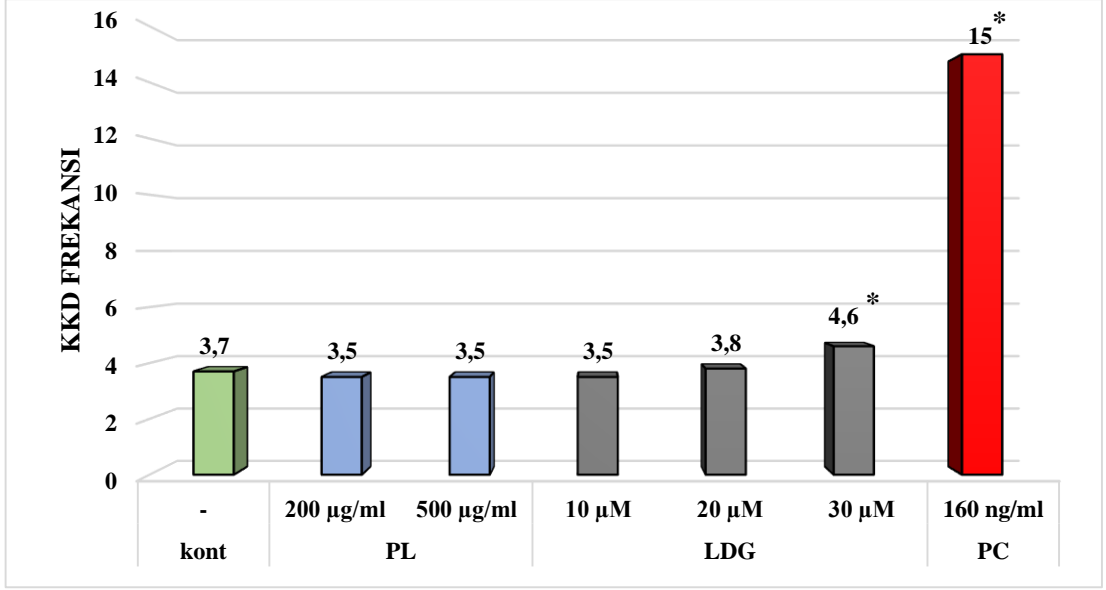
Lenfosit hücrelerinde *P. lanceolata* ve LDG'nin olası genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan KKD testinde; *P. lanceolata*'nın iki farklı dozu (200 ve 500 µg/ml) ve LDG'nin üç farklı dozu (10, 20 ve 30 µM) uygulandı. Tablo 4.1'de *P. lanceolata* ekstratı ve LDG uygulamalarının lenfosit hücrelerinde KKD frekansına etkileri gösterilmiştir.

Buna göre; pozitif kontrol olarak çalışılan siklofosfamid grubu (160 ng/ml) negatif kontrol hücrelerine göre anlamlı yüksek KKD gösterdi. KKD frekansının *P. lanceolata*'nın her iki doz uygulama grubunda kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında değişmediği saptandı. Aynı şekilde uygulama grupları arasında da istatistiksel farklılık bulunmadı.

**Tablo 4.1.** Değişik Dozlarda *P. lanceolata* ve LDG ile Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Lenfositlerinde Ortalama KKD Sayısı

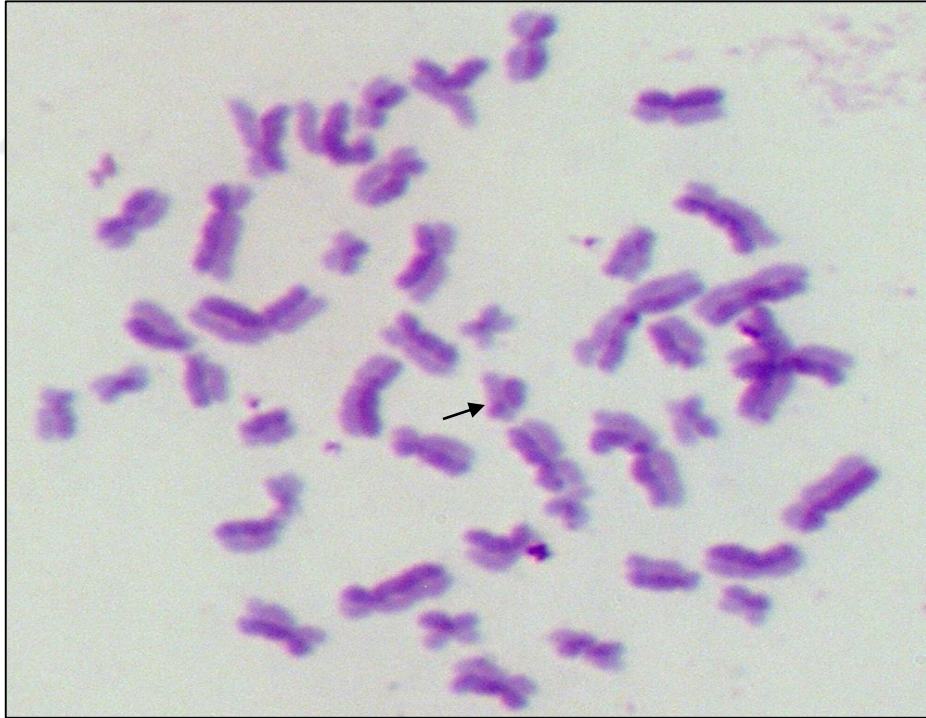
Grup	Grup sembolü	Konsantrasyon	KKD Median (min.-maks.)
Kontrol	A	-	3.7 (1-5,5) <sup>B,G</sup>
Pozitif Kontrol (Siklofosfamid)	B	160 ng/ml	15 (8-24) <sup>A,C,D,E,F</sup>
<i>P. lanceolata</i>	C	200 µg/ml	3.5 (1,5-8) <sup>B</sup>
<i>P. lanceolata</i>	D	500 µg/ml	3.5 (1,5-5,5) <sup>B</sup>
LDG	E	10 µM	3.5 (1,5-5) <sup>B,G</sup>
LDG	F	20 µM	3.8 (1-7,5) <sup>B</sup>
LDG	G	30 µM	4.6 (1,5-6,5) <sup>A, B, E</sup>
p-değeri			<0.001

**NOT:** Üst semboller kontrol gruplar, grup içi ve gruplar arası anlamlı farklı.



Not: “\*” kontrole göre anlamlıdır.

**Şekil 4.1.** *P. lanceolata* ekstratı ve LDG ile muamele edilen lenfosit hücrelerinde KKD sıklığının grafik halinde gösterilmesi. P-değeri <0,001'dir.



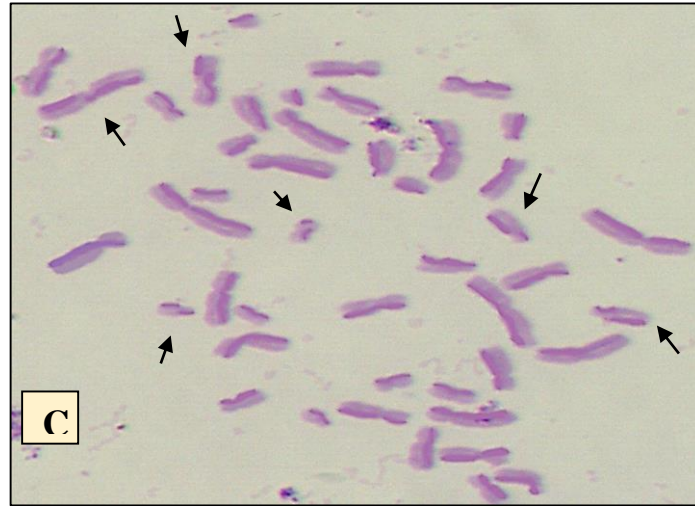
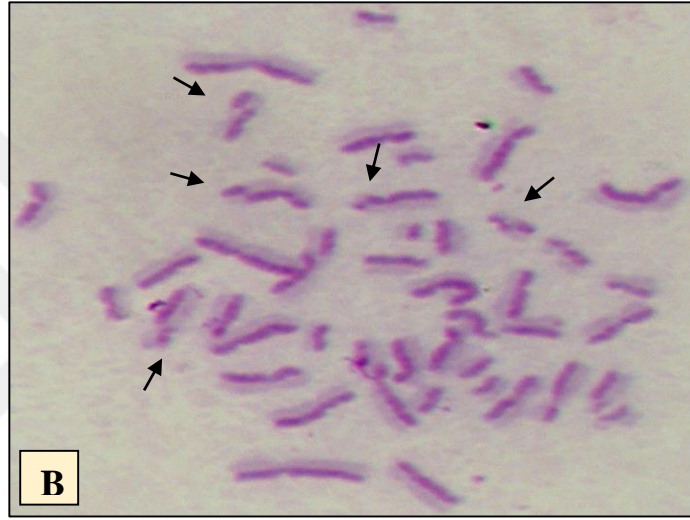
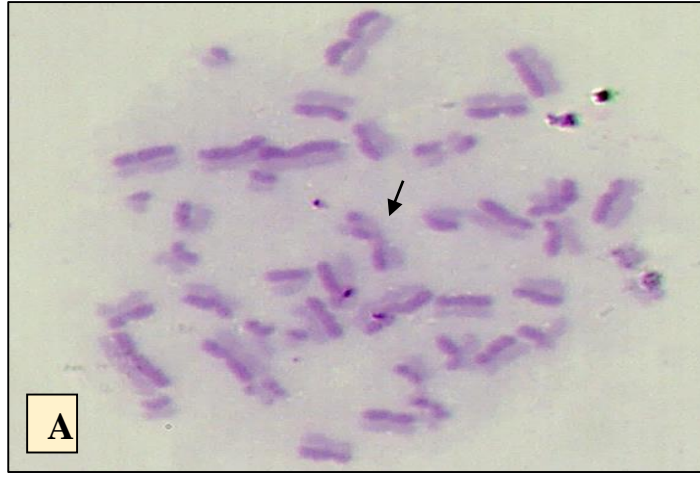
**Şekil 4.2.** *P.lanceolata* 200 µg/ml ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi. (x1000)



**Şekil 4.3.** *P.lanceolata* 500 µg/ml ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi. (x1000).

LDG`nin 10 ve 20 µM doz uygulamaları KKD sıklığı bakımından kontrol grubuna göre farklılık göstermedi. LDG`nin yüksek dozu ( 30 µM) ise kontrol grubuna göre KKD frekansını istatistiksel olarak artırdı. Grup içi karşılaştırmada ise minimal ve orta doz uygulamalarının KKD ortalamaları birbirinden farklı bulunmazken yüksek doz grubunda KKD ortalamasında anlamlı artış bulundu.





**Şekil 4.4.** LDG farklı dozlarının muamelesinden elde edilen KKD görüntüsü A; 10  $\mu$ M B; 20  $\mu$ M, C; 30  $\mu$ M (x1000).

#### 4.2. *P. lanceolata*'nın ve LDG' nin Lenfosit Hücrelerinde Komet Parametreleri Üzerine Etkileri

Lenfosit hücreleri *P. lanceolata* ekstraktının ve LDG'nin farklı dozlarıyla 24 saat kültür sonrası komet analizi yapıldı. Komet testinde % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametreleri değerlendirmeye alındı. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 200 µM dozu kullanıldı. Kontrol grubu % DNA<sub>T</sub> ortalaması 28,5 ve Tail moment ortalaması 0,45 olarak belirlenirken pozitif kontrol grubunda bu değerler sırasıyla 49,91 ve 4,76 olarak kaydedildi. Buna göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması komet parametreleri açısından negatif kontrole göre anlamlı artış göstererek DNA hasarına neden oldu. Tablo 4.2'de *P. lanceolata* methanol ekstratı ve LDG'nin lenfosit hücrelerinde muamelesi sonucu komet parametreleri gösterilmiştir.

Buna göre; *P. lanceolata* ekstaktının 200 µg/ml düşük doz uygulaması kontrole göre komet parametrelerinde azalmaya neden olurken 500 µg/ml konsantrasyonunun komet değerlerini anlamlı artırdığı belirlendi. Her iki doz grubunun komet değerleri pozitif kontrole göre anlamlı düşük bulundu. Grup içi karşılaştırmada ise bitki ekstraktının yüksek dozunun düşük doz uygulamasına kıyasla % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametrelerini anlamlı artırdığı saptandı.

LDG'nin üç farklı konsantrasyonları lenfosit hücrelerinde muamele edilip komet analizi bakımından kontrol grupları ile karşılaştırıldı. LDG'nin tüm gruplarında komet değerleri pozitif kontrole göre anlamlı düşük bulunurken negatif kontrole göre yapılan karşılaştırmada % DNA<sub>T</sub> bakımından LDG'nin 10 ve 30 µM dozlarında değerlerinde anlamlı bir artış görülürken tail moment bakımından sadece yüksek doz grubu anlamlı artış görüldü. LDG uygulama gruplarının grup içi karşılaştırmasında ise LDG'nin yüksek doz grubu (30 µM) diğer doz gruplarına göre % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametreleri yönünden anlamlı yüksek bulundu.

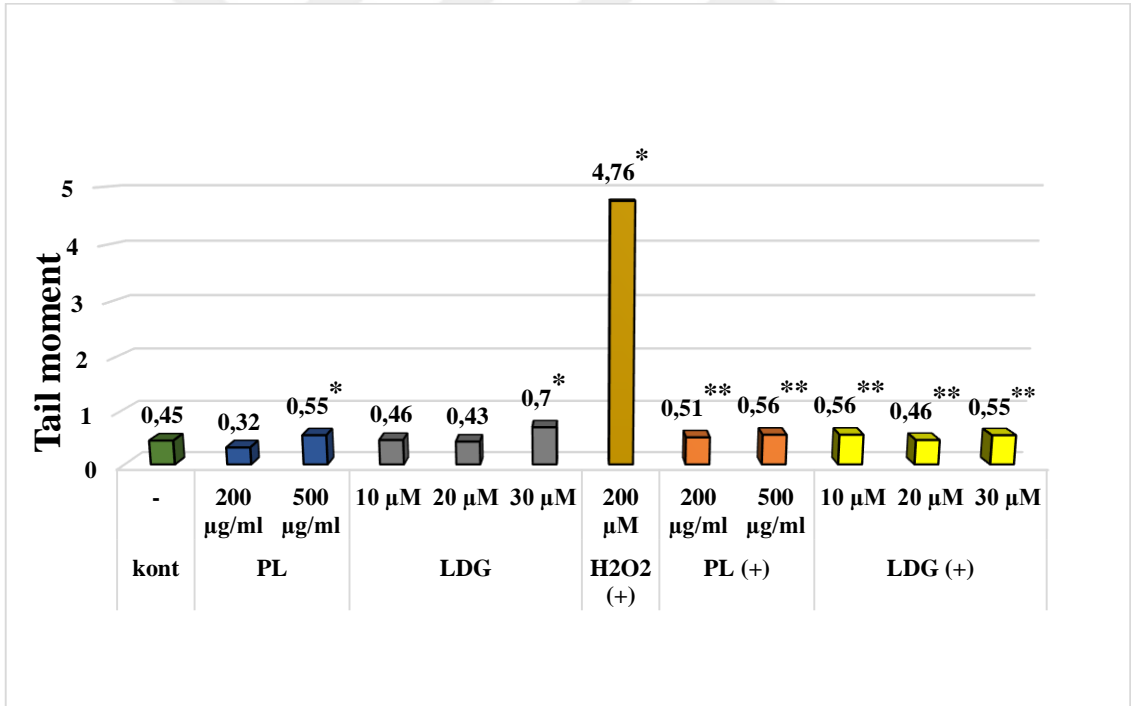
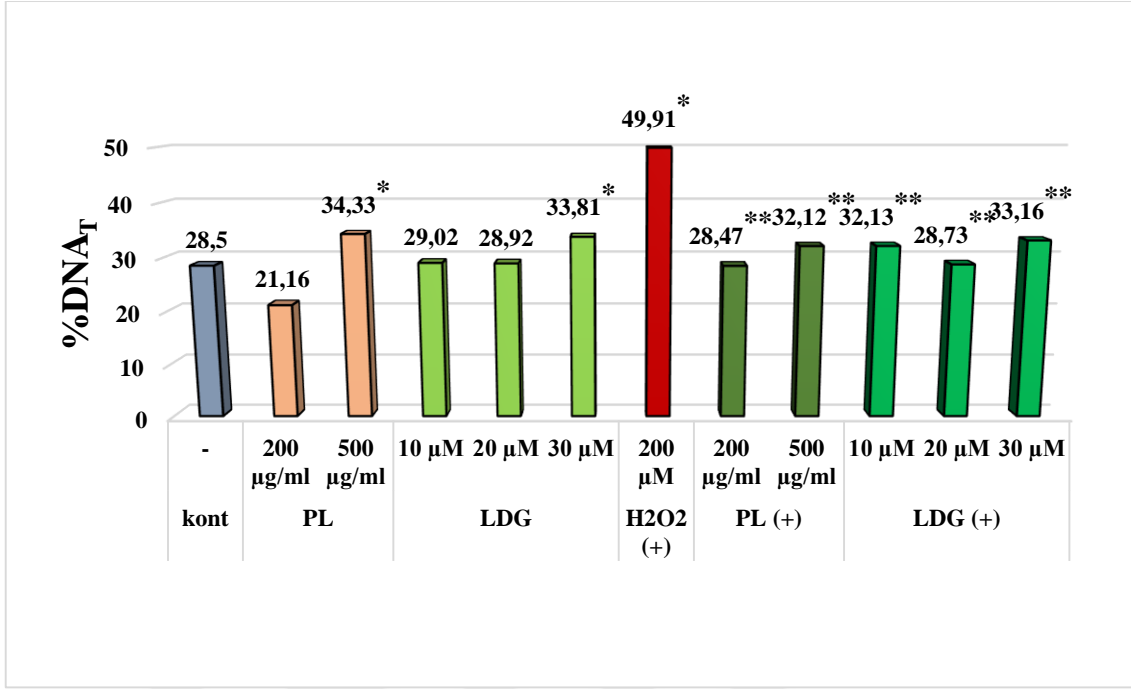
Çalışmamızda ayrıca bitki ekstraktı ve LDG'nin farklı dozları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı oluşturulmuş lenfosit hücrelerine uygulandı. Buna göre *P. lanceolata* ekstraktının her iki doz uygulaması da pozitif kontrole göre komet parametrelerini istatistiksel olarak anlamlı azaltarak antijenotoksik etki gösterdi. Gruplar arasında ise düşük doz bitki ekstraktı uygulamasının antijenotoksik etkisi yüksek doz grubuna göre daha anlamlı bulundu.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı oluşturulan lenfosit hücrelerinde LDG'nin dozları kombine uygulandığında LDG'nin her üç dozu da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna göre % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment değerlerini anlamlı oranda azaltarak antigenotoksik etki gösterdi. LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kombine gruplarında yapılan karşılaştırmada test grupları arasında LDG'nin 20 µM dozu diğer dozlara göre % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametrelerinde azalışı anlamlı bulundu.

**Tablo 4.2.** *P.lanceolata* ekstratı ve LDG'nin farklı dozları ile 24 saat muamele edilen lenfositlerde komet hasar skorlarının karşılaştırılması.

Gruplar (n=100)	Grup sembölü	Konsantrasyon	DNA tail Median (min-max)	Tail moment Median (min-max)
Kontrol	A	-	28.5 (18.51-44.76) <sup>B,C,D,E,G,I,J,L</sup>	0.45(0.17-1.13) <sup>B,C,D,G,H,I,J,L</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	B	200 µM	49.91(30.3278.27) <sup>A,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L</sup>	4.76(1.6-9.83) <sup>A,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L</sup>
<i>P.Lanceolata</i>	C	200 µg/ml	21.16(16.8-36.61) <sup>A,B,D,H,I</sup>	0.32(0.19-0.92) <sup>A,B,D,H,I</sup>
<i>P.Lanceolata</i>	D	500 µg/ml	34.33 (20.4-55.26) <sup>A,B,C,H,K</sup>	0.55(0.22-1.46) <sup>A,B,C,K</sup>
LDG	E	10 µM	29.02 (19.29-59.23) <sup>A,B,G,J,L</sup>	0.46(0.19-1.23) <sup>B,F,G,J,L</sup>
LDG	F	20 µM	28.92 (19.17-62.51) <sup>B,G,J,L</sup>	0.43(0.22-1.77) <sup>B,E,G,J,L</sup>
LDG	G	30 µM	33.81 (20.16-54.39) <sup>A,B,E,F,K</sup>	0.70(0.3-1.42) <sup>A,B,E,F,K,L</sup>
<i>P. lanceolata</i> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H	200 µg/ml	28.47 (21.79-63.03) <sup>B,C,D,I</sup>	0.51(0.33-4.94) <sup>A,B,C,I</sup>
<i>P. lanceolata</i> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	I	500 µg/ml	32.12 (26.28-53.23) <sup>A,B,C,H</sup>	0.56(0.34-1.52) <sup>A,B,C,H</sup>
LDG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	J	10 µM	32.13 (25.72-60.47) <sup>A,B,E,F,K</sup>	0.56(0.34-2.37) <sup>A,B,E,F,K</sup>
LDG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	K	20 µM	28.73 (20.83-41.99) <sup>B,G,J,L</sup>	0.46(0.26-0.96) <sup>B,G,J,L</sup>
LDG +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L	30 µM	33.16 (24.39-50.51) <sup>A,B,E,F,K</sup>	0.55(0.31-0.99) <sup>A,B,E,F,G,K</sup>
p-value			<0.001	<0.001

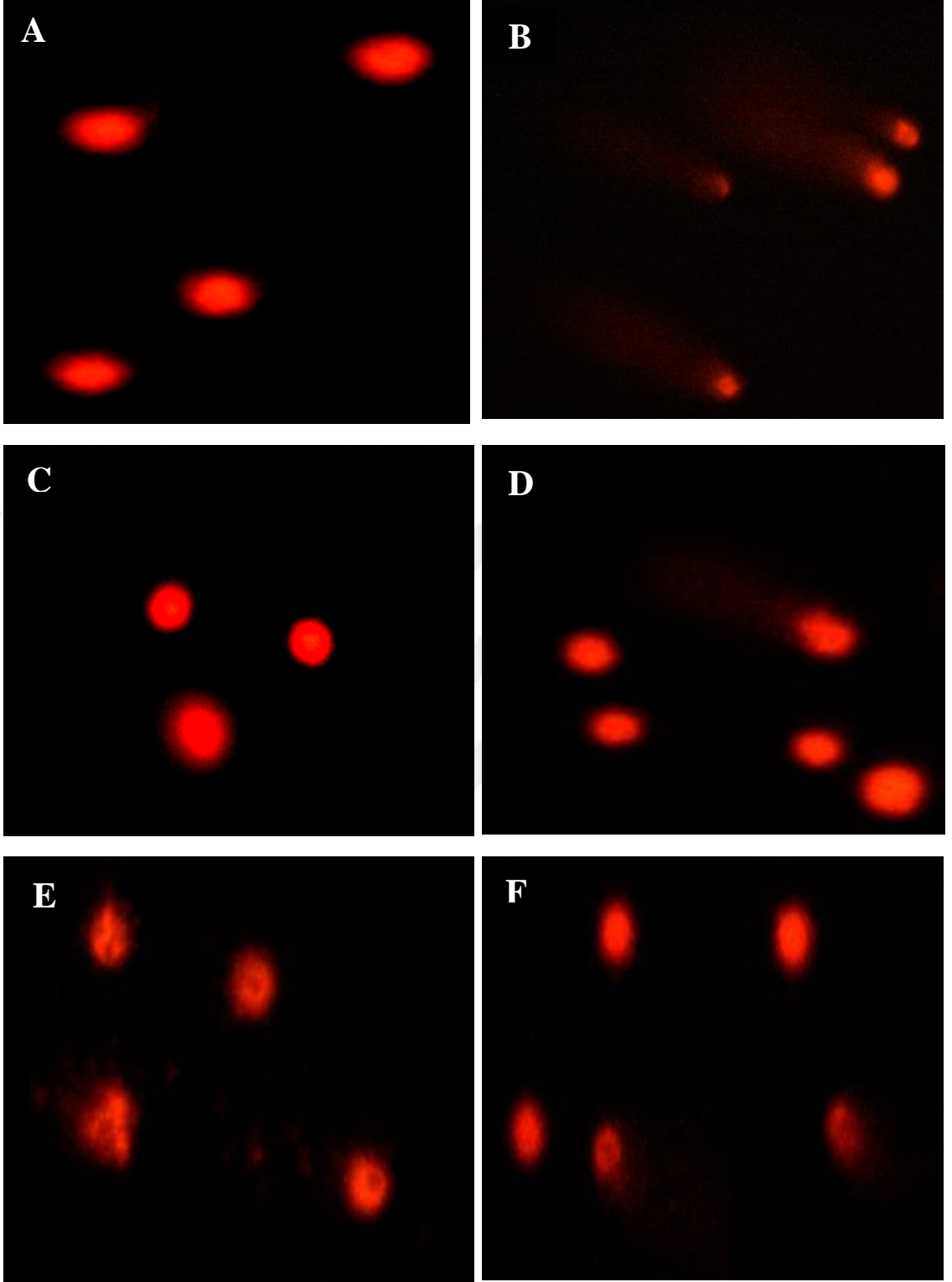
**NOT:** Üst semboller kontrol gruplar, grup içi ve gruplar arası anlamlı farklı.



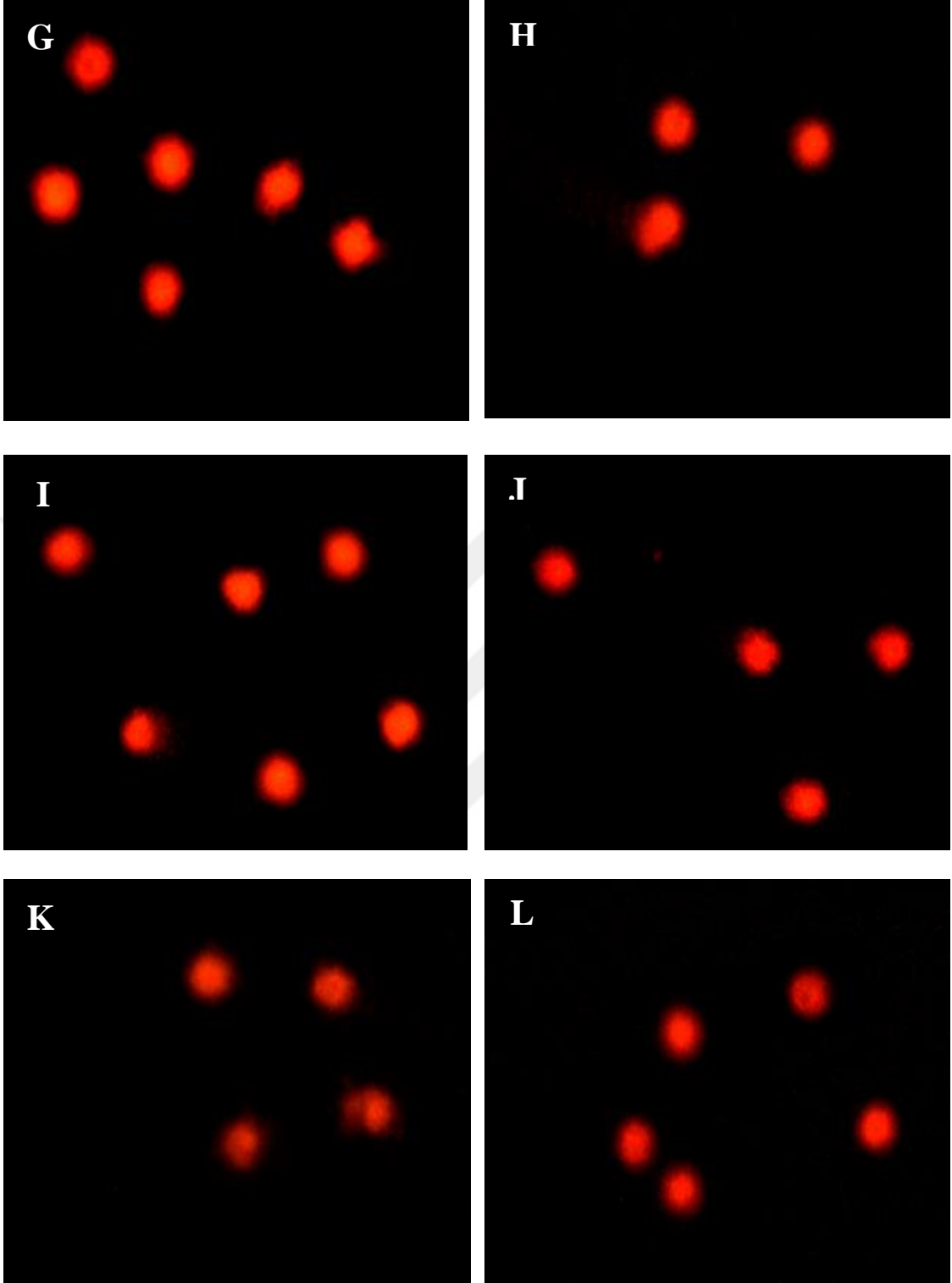
Not: “\*” kontrole göre anlamlıdır.

“\*\*” pozitif kontrole göre anlamlıdır.

**Şekil 4.5.** Lenfosit hücrelerinde *P. lanceolata* (PL), LDG ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’li kombine gruplarının farklı doz uygulamaları sonucu alkali komet skorlarının gösterimi (P <0,001).



**Şekil 4.6.** Lenfosit hücrelerinde örnek komet görüntüleri A; Kontrol grubu, B; Pozitif kontrol grubu (200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), C; 200 μg/ml *P. lanceolata* grubu, D; 200 μg/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, E; 500 μg/ml *P. lanceolata* grubu, F; 500 μg/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu.



**Şekil 4.7.** Lenfosit hücrelerinde örnek komet görüntülerinin devamı G; 10  $\mu$ M LDG grubu, H; 10  $\mu$ M LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, I; 20  $\mu$ M LDG grubu, J; 20  $\mu$ M LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, K; 30  $\mu$ M LDG grubu, L; 30  $\mu$ M LDG + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu.

### 4.3. *P. lanceolata*'nın ve LDG'nin HepG-2 hücrelerinde komet parametreleri üzerindeki etkileri

Tablo 4.3'de *P. lanceolata* metanol ekstratı ve LDG'nin farklı doz uygulamalarının Hep-G2 hücrelerinde muamelesi sonucu komet analiz verileri görülmektedir. Buna göre; *P. lanceolata*'nın 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonları Hep-G2 hücrelerinde uygulanması sonucu kontrol grubuna göre karşılaştırıldı. Her iki doz grubunda % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment ortalamalarının kontrole göre anlamlı arttığı belirlendi. Yüksek doz bitki ekksratı uygulamasının genotoksik etkisi düşük doza göre daha fazla oldu.

LDG'nin üç farklı konsantrasyonları Hep-G2 hücrelerinde muamele edilip kontrol grubuyla karşılaştırıldı. LDG'nin tüm dozlarında kontrole göre komet parametreleri bakımından anlamlı bir artış tespit edildi. Uygulama grupları arasında ise LDG'nin 20 ve 30 µM dozları kendi aralarında farklılık göstermezken 10 µM doz grubunda artış diğerlerine göre daha fazla bulundu.

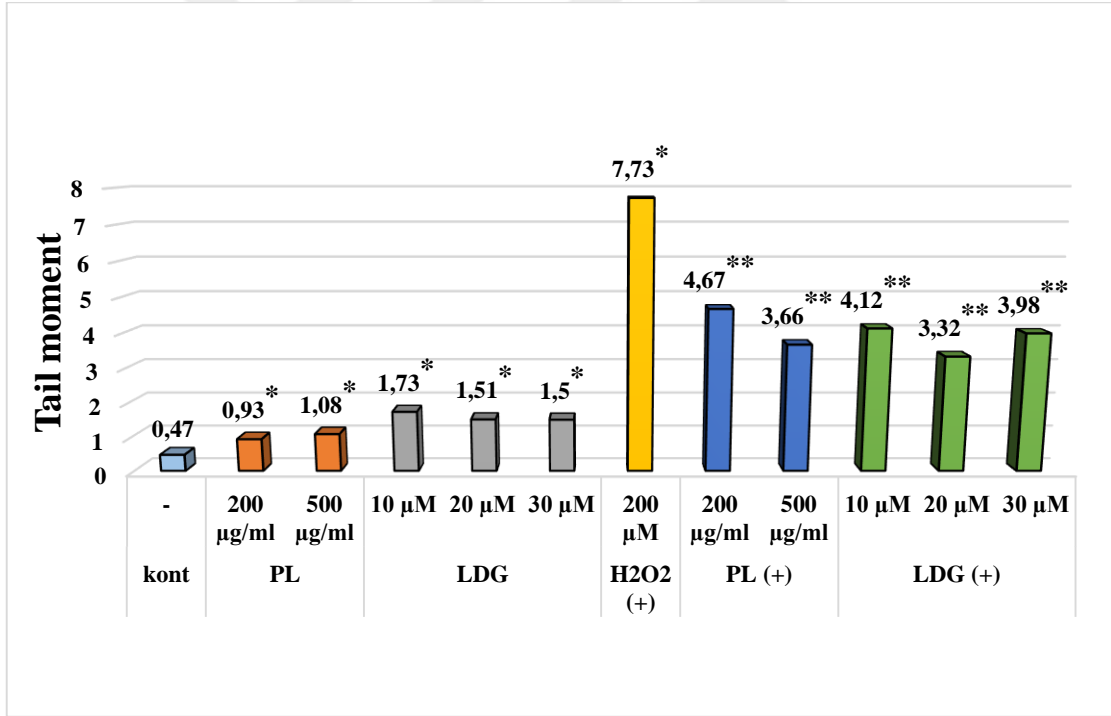
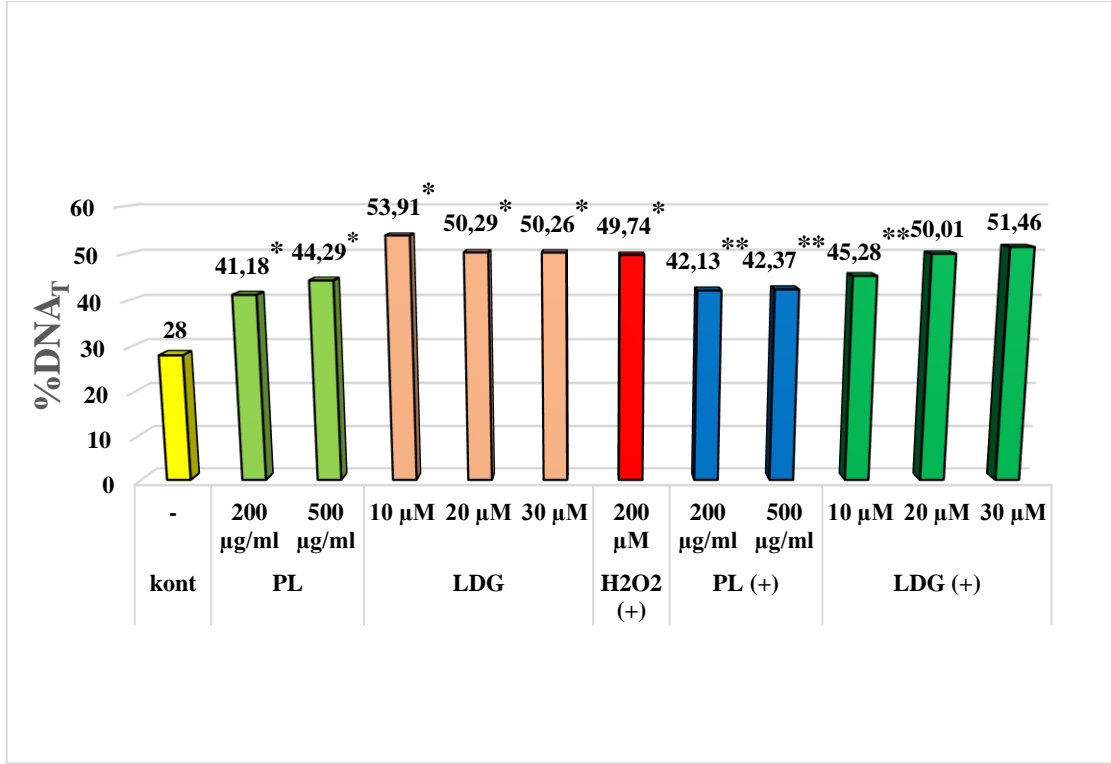
Hep-G2 hücrelerinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hasarlı hücelere bitki ekstratı ve LDG uygulayarak kombine gruplar oluşturduk. Buna göre komet parametreleri bakımından *P. lanceolata*'nın tüm dozları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna göre anlamlı azalmaya neden oldu. LDG'nin kombine uygulamasında ise, sadece LDG'nin düşük doz grubu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna göre % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden oldu.

**Tablo 4.3.** *P.lanceolata* ekstraktı ve LDG'nin farklı dozları ile 24 saat muamele edilen Hep-G2 hücrelerinde komet hasar skorlarının karşılaştırılması.

Gruplar (n=50)	Grup sembolü	Konsantrasyon	DNA tail Median (min-max)	Tail moment Median (min-max)
Kontrol	A	-	28(18.92-40.02) <sup>B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L</sup>	0.47(0.22-2.85) <sup>B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	B	200 µM	49.74(27.05-69.25) <sup>A,C,D,E,H,I,J</sup>	7.73(1.66-14.16) <sup>A,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L</sup>
<i>P. lanceolata</i>	C	200 µg/ml	41.18(29.6-52.28) <sup>A,B,D,H</sup>	0.93(0.57-1.69) <sup>A,B,D,H,I</sup>
<i>P. lanceolata</i>	D	500 µg/ml	44.29(34.23-55.52) <sup>A,B,C</sup>	1.08(0.56-2.14) <sup>A,B,C,H,I</sup>
LDG	E	10 µM	53.91(41.48-66.95) <sup>A,B,F,G,J,K,L</sup>	1.73(0.93-3.31) <sup>A,B,J,K,L</sup>
LDG	F	20 µM	50.29(39.22-60.04) <sup>A,E,J</sup>	1.51(0.94-2.92) <sup>A,B,J,K,L</sup>
LDG	G	30 µM	50.26 (37.3-61.86) <sup>A,E,J</sup>	1.5 (0.8-2.24) <sup>A,B,J,K,L</sup>
<i>P. lanceolata</i> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H	200 µg/ml	42.13(25.49-69.33) <sup>A,B,C</sup>	4.67(0.56-11.17) <sup>A,B,C,D</sup>
<i>P. lanceolata</i> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	I	500 µg/ml	42.37(28.93-60.67) <sup>A,B</sup>	3.66(0.5-7.53) <sup>A,B,C,D</sup>
LDG+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	J	10 µM	45.28(30.71-62.83) <sup>A,B,E,F,G,K,L</sup>	4.12(0.6-7.72) <sup>A,B,E,F,G,K</sup>
LDG+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	K	20 µM	50.01(30.05-71.06) <sup>A,E,J</sup>	3.32(0.52-9.13) <sup>A,B,E,F,G,J</sup>
LDG+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L	30 µM	51.46(32.77-72.56) <sup>A,E,J</sup>	3.98(1.02-11.13) <sup>A,B,E,F,G</sup>
p-value			<0.001	<0.001

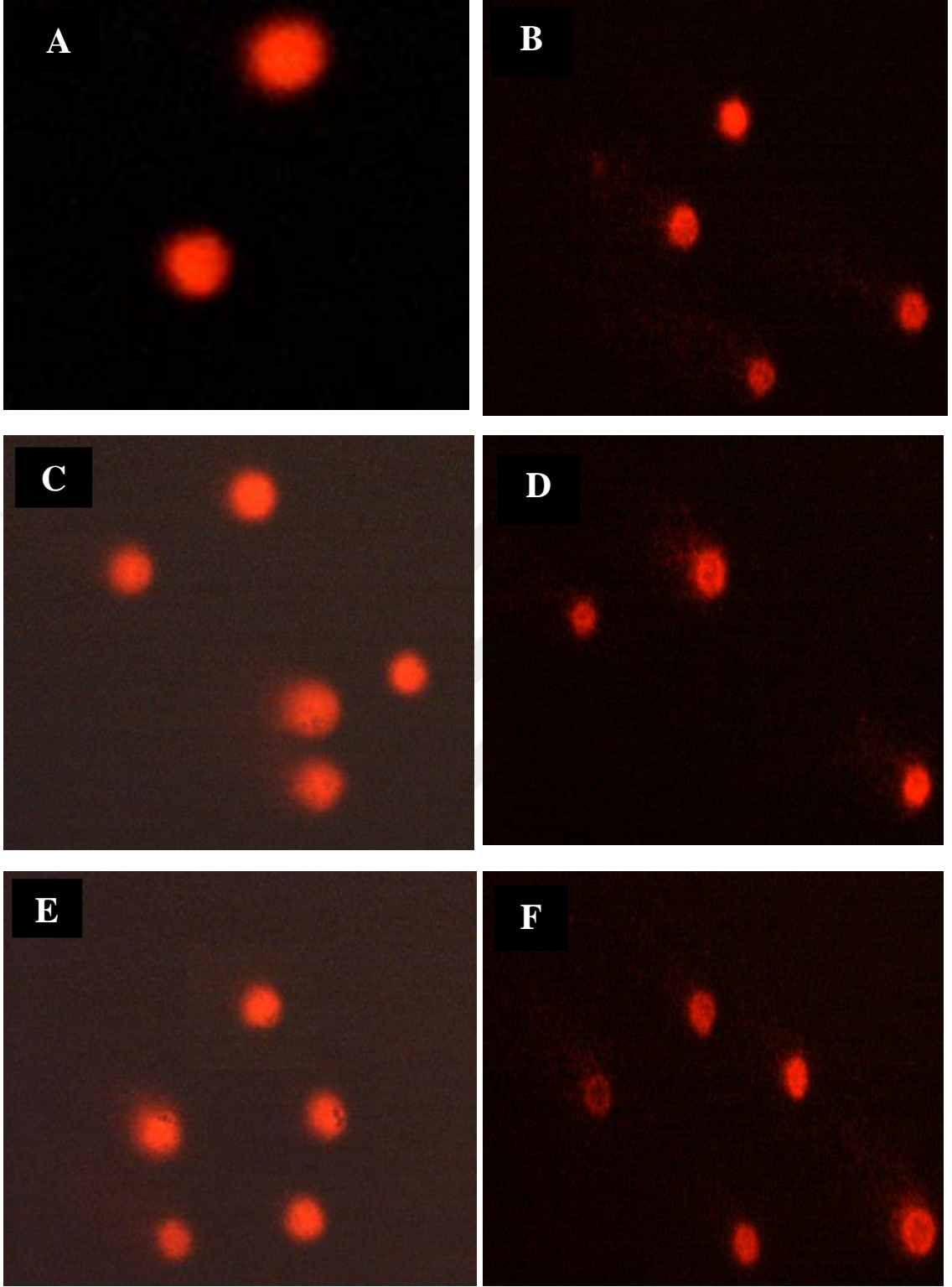
**NOT:** Üst semboller kontrol gruplar, grup içi ve gruplar arası anlamlı farklı.



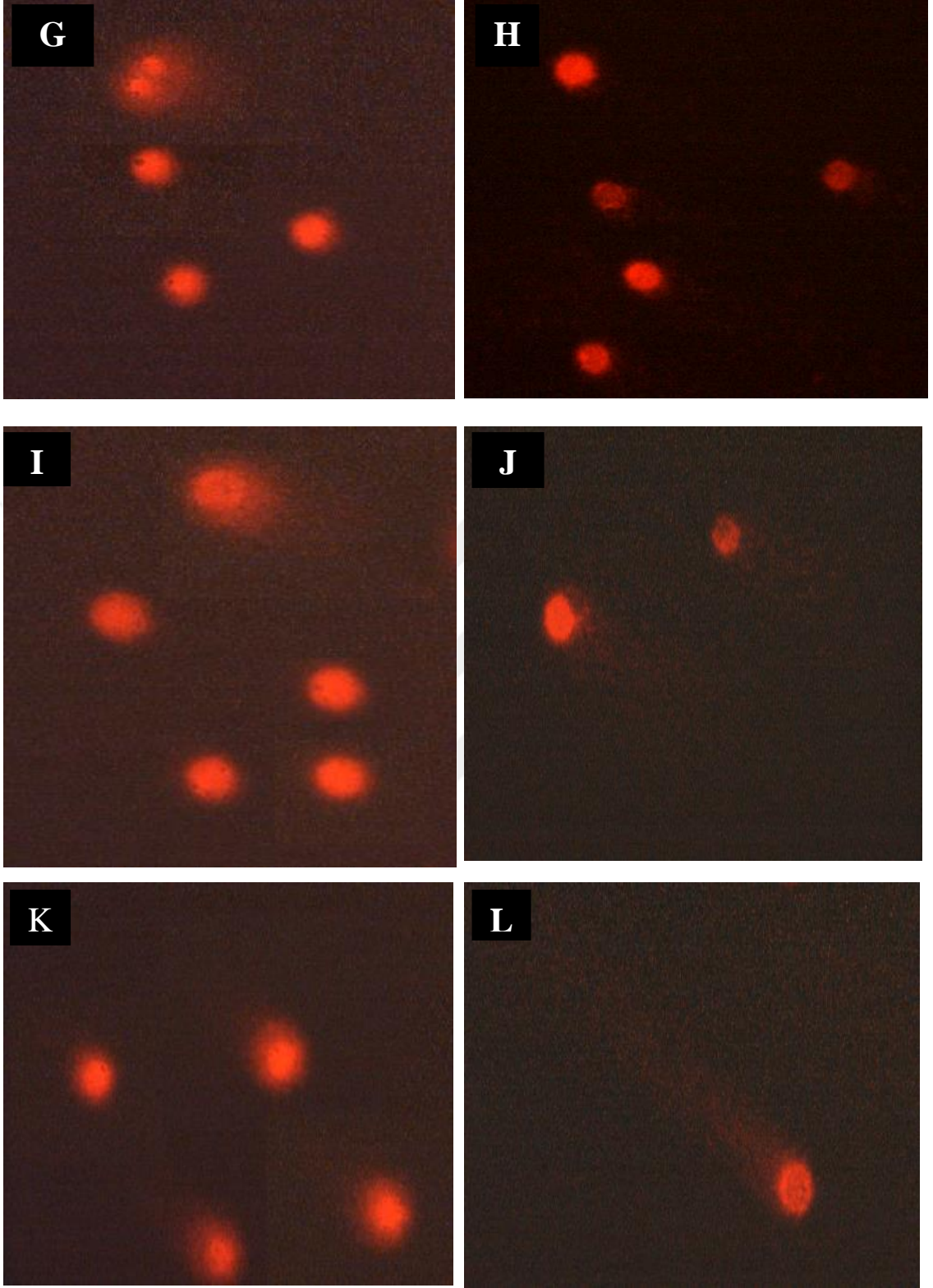


Not: “\*” kontrole göre anlamlıdır.  
 “\*\*” pozitif kontrole göre anlamlıdır.

**Şekil 4.8.** Hep-G2 hücrelerinde *P. lanceolata* (PL), LDG ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’li kombine gruplarının farklı doz uygulamaları sonucu alkali komet skorlarının gösterimi (P <0,001).



**Şekil 4.9.** Hep-G2 hücrelerinde örnek komet görüntüleri A; Kontrol grubu, B; Pozitif kontrol grubu (200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), C; 200  $\mu$ g/ml *P. lanceolata* grubu, D; 200  $\mu$ g/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu, E; 500  $\mu$ g/ml *P. lanceolata* grubu, F; 500  $\mu$ g/ml *P. lanceolata* + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu.



**Şekil 4.10.** Hep-G2 hücrelerinde örnek komet görüntülerinin devamı G; 10  $\mu\text{M}$  LDG grubu, H; 10  $\mu\text{M}$  LDG +  $\text{H}_2\text{O}_2$  grubu, I; 20  $\mu\text{M}$  LDG grubu, J; 20  $\mu\text{M}$  LDG +  $\text{H}_2\text{O}_2$  grubu, K; 30  $\mu\text{M}$  LDG grubu, L; 30  $\mu\text{M}$  LDG +  $\text{H}_2\text{O}_2$  grubu.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma, halk arasında başta yara iyileştirici özelliği olmak üzere çeşitli hastalıkların iyileştirilmesi veya belirtilerinin giderilmesi amacıyla tüketilen *Plantago lanceolata* (sinir otu) bitkisinin DNA hasarlı hücrelerde antigenotoksik özelliklerini ortaya koymak üzere planlandı. Çalışmada bitkinin tüm komponentleri ile birlikte etkisinin yanı sıra bitkinin ana bileşenlerinden olan luteolin (LDG) flavonoidinin etkisi de ayrıca çalışıldı. Çalışmada, insan periferik lenfositleri ve hepG2 hücreleri *in vitro* olarak 200 ve 500µg/ml konsantrasyonlarındaki bitki ekstratı ve 10, 20 ve 30 µM LDG konsantrasyonları ile muamele edildi ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Sinir otu (*P. lanceolata*), dünyada ve Anadolu'da geniş yayılım gösteren, oldukça acı olup insan ve hayvanlarda gıda ürünü olarak kullanılmasının yanı sıra fitoterapik özellikleri de bilinen bir bitki türüdür. Halk arasında yara lapası olarak, mide rahatsızlıkları, kuru öksürük, idrar yolları problemleri, gastrik ve peptik ülserler ve hemoroid rahatsızlıkları için sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *P. lanceolata* bitkisinde; flavonoidler (baisalein, LDG), monoterpeneoidler (linalool), triterpeneoidler (oleanolik asit, urkolik asit), iridoid glikozidler (aukubin) ve fenolik komponentler (kafeik asit, kloragenik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve vanilik asit) olmak üzere 5 temel grup biyokimyasal bileşen içerdiği bildirilmiştir (9). LDG flavonoidi *P. lanceolata* bitkisinin en önemli bileşenlerinden olup çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurabilen güçlü bir antikanserojen ajan olduğu bildirilmiştir (10). LDG'nin mide kanserinde hücre poliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu doza bağımlı olarak baskılayıp ve apoptozu indüklediği ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişi tersine çevirerek mide kanserinin ilerlemesini durdurduğu rapor edilmiştir (11). Bu özelliklerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

*P. lanceolata* ve LDG'nin birlikte sitotoksik/antisitotoksik ve genotoksik/antigenotoksik etkilerine yönelik yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu çalışma DNA hasarı oluşturulmuş Hep-G2 ve insan lenfosit hücrelerinde, *P. lanceolata*'nın metanol ekstraktının ve LDG'nin doza bağımlı olarak olası iyileştirici etkileri komet ve KKD testi ile araştırıldı.

Yaptığımız bu çalışmada test maddelerinin genotoksik/antigenotoksik etkilerini ortaya koyabilmek amacıyla insan lenfosit ve HepG2 hücreleri kullanılmıştır. İnsan lenfosit hücrelerinin kolay ve çok miktarda elde edilebilmeleri, düşük oranda spontan kromozom hasarı içermeleri nedeniyle *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilmiştir. Ayrıca dolaşım sistemi hücreleri oldukları için dolaşım sistemi sayesinde tüm doku ve organlara ulaşabilirler. Bu nedenle mutajen ajanlara karşı oldukça hassastırlar (120-122). Çalışmada ayrıca test maddelerinin hepatotoksik/antihepatotoksik etkilerini ve kanser hücrelerindeki etkilerini görmek amacıyla HepG2 hücreleri çalışıldı.

Yapısal olarak bir maddenin, genotoksik etkilerini sitogenetik parametrelerle saptamak amacıyla maddenin muamele süresi hücre bölünmesi dikkate alınarak 24, 48 veya 72 saat olarak belirlenir (123). Çalışmamızda kültürdeki memeli hücrelerin yaklaşık olarak hücre bölünmesi 24 saat olduğu için, komet testinde kullandığımız hem lenfosit hemde Hep-G2 hücrelerinin kültürde kalma süreleri 24 saat olarak belirlendi. KKD testinde ise hücrelerinin hücre bölünmesi 24 saat olmasına karşı ikinci ve üçüncü mitozların gözleyebilmek için kültür süresi 72 saat olarak belirlendi.

Gün içerisinde kullandığımız veya maruz kaldığımız çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların karsinojenik ve mutajenik özellikleri genotoksisite testlerle belirlenir. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* testler yardımıyla karsinojen/mutajen olduğu bilinen ya da tahmin edilen birçok kimyasalın etki mekanizmaları anlaşılmıştır (121, 124, 125). Bu testlerde kimyasal bir ajanın genetik hasara neden olduğu görüldüğünde genotoksik, eğer genetik hasarı azaltıyor ise antigenotoksik olarak değerlendirilmektedir (126, 127).

Genotoksisite çalışmalarında, hiçbir test maddesi uygulanmadığı kontrol grubunun yanı sıra yüksek genotoksisite potansiyeli olan test maddelerinin kullanıldığı pozitif kontrol grubu da oluşturulur. Maksimum genetik hasar yapan bu grup diğer deney gruplarının genotoksik potansiyelini ölçmek için referans olarak kullanılır. Yaptığımız çalışmada komet testi için hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), KKD testi için ise CP pozitif kontrol olarak çalışıldı. Çalışmanın komet testi kısmında DNA hasarını, indüklemek için kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Fenton, Haber-Weiss reaksiyonları ile okside baz oluşumunda rol oynayarak hidroksil radikali ve hipokloröz asit gibi birçok oksidanın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (128). Ayrıca DNA'da ROS tarafından indüklenen tek veya çift zincir kırıkları ve baz modifikasyonları gibi hasarların oluşmasına öncülük etmektedir (128, 129). Çalışmamızda her iki hücre tipinde de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile komet oluşumu önemli

oranda arttığı görüldü, böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek genotoksik potansiyeli ortaya kondu. KKD testi için pozitif kontrol olarak kullanılan CP ise kemoterapotik ve immünsüpresif bir ajan olup bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. CP'nin aktif bileşenleri akrolein ve fosforamidir. DNA'ya kovalent bağlanan akrolein ve fosforamid DNA sentezi için gerekli proteinleri inaktive eder ve hücre gelişimini yavaşlatır. Birçok çalışmada insan ve hayvanlar üzerinde karsinojenik etkisi bildirilmiştir (130-132). Somatik hücreler üzerinde CP ile yapılan çalışmalarda gen mutasyonları, kromozom aberasyonları ve anöplidilerin yüksek sıklıkta olduğu bildirilmiştir (130). Çalışmamızda her iki hücre tipinde de CP uygulaması ile DNA çift zincir kırıklarına bağlı olarak oluşan KKD sıklığında kontrole göre önemli oranda arttığı görüldü.

Çalışmamızda *P. lanceolata* ve LDG dozunun belirlenmesinde daha önce yapılmış olan çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur. Bunun için yapılan literatür araştırmasında Harutyunyan K. ve ark. tarafından yapılan çalışmada kullanmış oldukları MN testindeki *P. lanceolata*'nın 100, 200, 500, 1000, 2000 µg/ml konsantrasyonları referans olarak alınmıştır (111). LDG için ise Zang M. ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada kullanmış oldukları 10, 20 ve 30 µM konsantrasyonlar referans olarak alınmıştır (59).

KKD testi, olası mutajenik ve karsinojenik ajanların klastojenik potansiyelinin belirlenmesinde kullanılan en hassas indikatör testler arasında yer almaktadır (133). KKD oluşumunda DNA'nın çift ipliği kırılır ve özdeş DNA molekülleri arasında değişim gerçekleşir. Bir kimyasalın KKD frekansında artışa neden olması, onun replikasyon mekanizmasını etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir (134). Yaptığımız çalışmada KKD frekansını belirlemek için her çalışma grubunda 2. mitoz (M2) bölünmeyi geçiren toplam 40 hücre incelendi. Buna göre bitki ekstratının her iki doz uygulaması KKD frekansını arttırmadı. Bitki ekstratları çeşitli bileşenlerin kompleks karışımından oluşur ve bu kompleks bileşenler hücresel düzeyde potansiyel risk oluşturabilir. Yaptığımız çalışmada *P. lanceolata* ekstratının 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarının KKD frekansını etkilemediği bulundu. *Plantago* cinsine ait farklı iki bitki türünün (*P. aviculare* ve *P. lanceolata*) ekstraktı ile yapılan bir çalışmada, bitki ekstraktlarının lenfosit hücre bölünme yeteneğini azaltmadığı, sadece 2000 µg/ml yüksek konsantrasyonda hücre bölünme yeteneğini %50'den fazla oranda azaldığı yine aynı çalışmada bitki ekstratlarının genotoksisite testlerinden olan MN oluşum frekansını etkilemediği yani genotoksik olmadığı rapor edilmiştir (111). *P. lanceolata* ekstraktlarının farelere 14 gün boyunca oral olarak uygulanması sonucu farelerin

ağırlıklarında, karaciğerlerinde, böbreklerinde, akciğerlerinde, dalaklarında herhangi bir anatomik anormallik rastlanmamıştır (135).

Bitki ekstratı bileşenlerinin kümülatif etkilerinin moleküler mekanizmayı açıklamadaki yetersizliği göz önüne alınarak bitkinin ana komponenti olan LDG'nin farklı dozları da çalışmaya dahil edildi. Deneysel çalışmalarda flavonoidlerin doza bağlı olarak memelilerde antigenotoksik, antioksidan, antimikrobial, antialerjik, antinflamatuar, ve antitümör gibi çok yönlü biyolojik etkileri gösterilmiştir (136, 137). Bazı flavonoidlerin çeşitli kanser hücrelerinde karsinojenlere karşı desmutajenik etki ile yani DNA hasarından sonra; mutajeni nötralize ederek veya DNA hasarından sonra radikal süpürücü aktivitesi ile antimutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (138). Flavonoidlerin çok yönlü olumlu özelliklerinin ortaya konduğu çalışmaların yanı sıra yüksek doz flavonoid maruziyetinde genotoksik etkilerin oluşabildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (139). Çalışmamızda LDG'nin 10 ve 20  $\mu\text{M}$  uygulamaları KKD sıklığını değiştirmezken LDG'nin yüksek dozu olan 30  $\mu\text{M}$  grubu kontrol grubuna göre KKD frekansını istatistiksel olarak artırdı. Çalışmamızda 30  $\mu\text{M}$  LDG'ye maruz kalan hücrelerde KKD frekansının yüksek bulunmasının nedeni yüksek doz uygulanması olarak açıklanabilir. Yaptığımız çalışmaya benzer bir çalışmada Erikel (2014) Cynarin'in ve LDG'nin 24 ve 48 saatlik süre ile ve farklı konsantrasyonlarda mitomisin-C (MMC) ile DNA hasarı indüklenmiş lenfositlere muamelesi sonucunda KA ve KKD frekansı gibi genotoksisite parametreleri ile replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI) gibi sitotoksisite parametrelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada her iki flavonoidin KKD frekansını etkilemediği gibi hasarlı hücrelerde LDG ve cynarin'in 48 saatlik uygulamada daha fazla olmak üzere tüm dozlarda KKD frekanslarını anlamlı azalttığı bildirilmiştir. KA testinde ise LDG ve Cynarin'in yüksek konsantrasyonları hariç flavonoidlerin herhangi bir genotoksisitesi saptanmamış hasarlı hücrelerde ise tüm dozların KA frekansını azalttığı ve antigenotoksik etki gösterdikleri rapor edilmiştir. RI bakımından her iki fenolik bileşimin hem tek başına hem de MMC ile eş zamanlı muameleleri sonucunda istatistiksel açıdan önemli bir değişime neden olmadıkları saptanmıştır. MI analizinde ise Cynarin ve LDG'nin, uygulama süresine bağlı olarak daha düşük dozlarda MI azalttığı böylece Cynarin ve LDG'nin yüksek konsantrasyonlarının insan lenfositlerinde sitotoksik etkili olabileceği ve MI'deki azalma ise oluşan kromozom anormalliklerin sebebiyle hücrelerin apoptoza yönelmeleri sonucunda meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (140). MMC ile DNA hasarı oluşturulmuş lenfosit hücrelerinde



farklı konsantrasyonlarda (0,39, 0,78, 1,56, 3,12 ve 6,25 µg/ml) LDG uygulanarak antigenotoksik etkilerin araştırıldığı başka bir çalışmada kromozom aberasyonu frekansında azalma olduğu gösterilmiştir (141).

Yapılan çalışmaların büyük kısmı LDG'in genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olmadığı yönündedir. Hatta LDG bileşeninin diğer birçok flavonoid bileşenlerine göre DNA hasar oluşumuna karşı koruyucu etkisinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Taj ve Nagarajan, (1996) tarafından yapılan bir çalışmada kızartılmış balık ve koyun eti özütlerinin Wistar Ratlarda yaptığı kromozomal değişimlere karşı quercetin ve LDG'nin iyileştirici etkileri kemik iliği hücrelerinde *in vivo* olarak kromozom aberasyonları yönünden araştırılmış ve LDG'nin ve Quercetin kullanılan tüm dozlarında kromozomal anormalili hücrelerin yüzdesini düşürdüğü ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada LDG'nin, quercetinden daha iyi genoprotektif bir etkiye sahip olduğu bu etkisinde radikal süpürücü aktivitelerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (142). LDG antigenotoksik etkisini hücre serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya antioksidan savunma sistemini aktive ederek yapmaktadır. Yapılan bir çalışmada CoCl toksisitesine maruz kalmış farelerde LDG veya gallik asid'in NO, MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (143).

Yapılan çalışmaların genelinde LDG'nin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin görülmediğini bildirirse de tam tersini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; LDG, kaempferol ve apigeninin insan lenfosit hücrelerinde sitotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada test maddelerinin 1, 3 ve 10 µM konsantrasyonlarda 2, 4 ve 18 saatlik süre ile muamele edilmesi sonucunda hücre canlılığını özellikle 10 µM'lık ve 18 saatlik uygulama gruplarında önemli oranda azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada flavonoidlerin insan lenfositleri üzerinde genel olarak apoptotik bir etki sergilediği ve özellikle LDG ve kaempferolün apoptozis indüksiyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir (144). Bir diğer çalışmada ise Hadži M. ve diğ. (2015) insan lenfositleri üzerinde LDG'nin etkisini belirlemek için yaptıkları *in vitro* çalışmada KA ve MN testi yapmışlardır. LDG'nin doza bağlı olarak kromatit tipi ve total yapısal kromozomal aberasyonları artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca donörler arası MN frekansı farklı çıkmıştır. Bu durum LDG'nin biyoaktivitesine ve hücrelerdeki olası metal iyonlarına bağlanmıştır. Aynı çalışmada halojenat boroksin (HB) ile LDG birlikte uygulandığında LDG'nin HB'nin oluşturduğu poliploidinin üzerinde inhibitör etki gösterdiği de rapor edilmiştir (139).



LDG ve türevlerinin genotoksik veya antigenotoksik etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılarak yapıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Luteolinin üç farklı türevinin (L7G, L7R ve L7GI) genotoksisite potansiyelinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; 10, 20 ve 40 µM konsantrasyonlarında glikozit türevlerinin hepsinin lenfosit hücrelerinde MN frekansını artırmadığı, aksine doza bağlı olarak MN frekansını azaltarak antigenotoksik etki gösterdikleri, hatta AFB1 mutajenik ajan ile DNA hasarı oluşturulmuş hücrelerde L7R ve L7GI'nin L7G'den daha güçlü anti genotoksik oldukları bildirilmiştir (145).

Bu tez çalışmasında bitki ekstratı ve LDG'nin olası genotoksik/antigenotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla komet analizi de yapıldı. Komet analizi tek veya çift zincir DNA kırılmalarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir genotoksisite testidir. DNA hasarı olan hücreler florasan mikroskop altında hasarın şiddetine göre kuyruklu yıldız şeklinde görülürler. Parçalanmamış, hasar almamış genetik materyal çekirdek içinde kalırlar. Komet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir (146, 147). Çalışmamızda DNA hasarının tespiti için %DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametreleri esas alınmıştır.

Çalışmamızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile genetik hasara uğratılmış lenfosit ve hepG2 hücrelerine *P. lanceolata* metanol ekstratının 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonları ile LDG'nin 10, 20 ve 30 µM konsantrasyonları uygulanarak olası antigenotoksik etkileri komet testi ile araştırıldı. Çalışma sonuçlarımıza göre; insan lenfosit hücrelerinde *P. lanceolata* ekstratının 500 µg/ml konsantrasyonu komet değerlerini anlamlı artırdığı belirlendi. Tıbbi bitkilerin ekstraktlarının antioksidan, antigenotoksik ve antikanserojen özellikleri çok sayıda çalışma ile ortaya konmuş olmasına karşın uygulanan dozun artmasıyla birlikte tüm bu özelliklerin tersine dönüşebildiği ve doza bağlı olarak bitki ekstraktlarının genotoksik hatta kanserojenik olabileceğine dair çalışmalarda bulunmaktadır (148). Çalışmamızda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı oluşturulmuş hücrelerde ise bitki ekstratının her iki dozunun da komet parametrelerini azaltarak antigenotoksik etki gösterdiği belirlendi. Komet verilerine göre lenfosit hücrelerindeki hasarı büyük bir oranla tamir ettiği görüldü. Ayrıca düşük doz bitki ekstraktı uygulamasının antigenotoksik iyileştirici etkisi yüksek doz grubuna göre daha anlamlı bulundu. Çalışmamızda bitki ekstratının DNA hasarlı

hücrelerde iyileştirici etkilerini DNA onarım mekanizmalarını çalıştırarak veya hasarlı hücrelerde artan serbest radikalleri süpüren enzim ve antioksidanları aktive ederek yaptığı düşünülmektedir (143).

Yaptığımız literatür taramalarında *P. lanceolata* ile ilişkili olarak hücrel ve genetik düzeyde toksisite ile ilgili çok az kaynak olması nedeniyle *Plantago* cinsinin diğer türleri ile yapılan çalışmalar incelenmiştir. Bu çalışmalardan birinde *P. majör*'ün tetraklorid karbonu (CCl<sub>4</sub>) ile uyarılan sıçanların, çeşitli dokularında antioksidatif potansiyeli araştırılmıştır. *P. Majör* ekstratının 100 mg/kg konsantrasyonunun CCl<sub>4</sub>'e maruz kalmış sıçanların sperm ve kemik iliği hücrelerinde DNA hasarını azalttığı ve antioksidatif etki gösterdiği bildirilmiştir (149). İnsan fetal akciğer hücrelerine bitki ekstraktı uygulamasının hücre büyümesini etkilediği rapor edilmiştir (23). Başka bir çalışmada *A. eksi*, *E. elatterium*, *M. charantia*, *P. major*, *U. dioica*, *V. albümü*, *S.triloba*, *E.rigida*, *S.lavandulifolia*, *A.nordmannia* gibi çeşitli bitki türlerinin antijenotoksik potansiyelleri karşılaştırılmış ve incelenen bitki ekstraktlarının hiçbirinin, TA98 ve TA100 suşlarında metabolik aktivasyon ile veya metabolik aktivasyon olmaksızın pozitif yanıt üretmedikleri ve lenfositlerde yapılan komet testinde DNA hasarlı hücreleri artırmadıkları bildirilmiştir (150). Henn ve ark. tarafından yapılan çalışmada *P. australis* ve *P. majör* ekstraktlarının sitotoksitesi incelenmiş ve sadece en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığının engellendiği tespit edilmiştir (151). Yüksel ark. yaptıkları çalışmada *Teucrium polium* ve *Rumex crispus* türlerinin ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda insan lenfosit hücrelerinde genotoksik olmayıp aksine DNA hasarlı hücrelerde genoprotektif olduklarını bildirmişlerdir (152).

Çalışmamızda, bitki ekstratının doza bağlı antijenotoksik etkisinin bitkinin ana bileşenlerinden olan LDG flavonoidi aracılığı ile olup olmadığı komet analizi ile araştırıldı. Buna göre sağlıklı insan lenfosit hücrelerinde bitki ekstrakt bulgularına uyumlu olarak sadece yüksek doz LDG grubunda DNA hasarına bağlı komet parametreleri artış gösterdi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı oluşturulmuş lenfositlerde ise LDG'nin tüm dozları iyileştirici etki göstererek antijenotoksik potansiyelini ortaya koydu. Yaptığımız çalışmaya benzer bir çalışmada lenfosit hücrelerine cynarin ve LDG flavonoidleri MMC ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı yapılmış hücrelere uygulanmış. Bu çalışmada her iki flavonoidin tek başına uygulandığında MN frekansını artırmadığı, MMC ile genetik hasar oluşturulmuş hücrelerde ise cynarinin en düşük konsantrasyonu (6,25 µg/mL) hariç diğer tüm konsantrasyonlarda, LDG de ise tüm konsantrasyonlarda

MN frekansını azalttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada her iki fenolik bileşiğin tek başına uygulandığında komet parametrelerini kontrole göre önemli ölçüde artırmadığı buna rağmen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kombine gruplarında ise cynarin ve LDG'nin tüm konsantrasyonlarda komet değerlerini azaltarak genoprotektif etki gösterdikleri rapor edilmiştir (140). Shen ve ark. yaptıkları bir çalışmada LDG'nin Bisfenol-A-glycidylmethacrylate (BisGMA) tarafından indüklenen genotoksositeye karşı koruyucu etkileri MN testi ile araştırılmıştır. Bunun için LDG'nin dört farklı konsantrasyonu (0.3, 1, 3 ve 10 µM) RAW-264.7 makrofaj hücrelerine uygulanmış ve LDG'nin en yüksek iki konsantrasyonunda MN frekansının önemli düzeyde azaldığı bunun sonucunda LDG'nin BisGMA'nın neden olduğu genotoksik etkilere karşı makrofajları koruduğu bildirilmiştir (153). Aynı çalışmada komet analizi de yapılmış ve LDG'nin dört farklı konsantrasyonu 30 dakika ön muamele şeklinde uygulanmıştır. LDG'nin en yüksek iki doz uygulamasının komet parametrelerini pozitif kontrole kıyasla önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Çalışmamızda maksimum LDG dozu (30 µM) benzer çalışmalardaki dozların çok üzerindedir. Flavonoidlerin yüksek dozlarda mutajenik ve genotoksik olabileceklerine dair literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır (144). Bizim çalışmamızda ise LDG'nin yüksek dozu (30 µM) genotoksik etki göstermiştir. Benzer bir çalışmada Rusak ve ark. LDG, kaempferol ve apigeninin genotoksik ve antijenotoksik etkilerini insan periferik lenfosit hücrelerinde komet testi ile incelemişlerdir. Bu çalışmada flavonoidler 2, 4 ve 18 saatlik sürelerde ve üç farklı konsantrasyonlarda (1, 3 ve 10 µM) hücelere uygulanmış sonuçta doza ve uygulama sürelerine bağlı olarak DNA hasarının artan oranlarda indüklendiği saptanmıştır. Bunun nedeni flavonoidlerin pro-oksidan aktivitelerine bağlı olarak DNA hasarına neden oldukları şeklinde yorumlanmıştır (144).

Flavonoidler içerisinde LDG diğer flavonoid bileşenlerine göre DNA hasarına karşı koruyucu etkisi daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Örneğin; Quercetin ve LDG'nin kızartılmış balık ve koyun eti özütlerinin genotoksitesine karşı antikanserojen etkisi rat kemik iliği hücrelerinde MN testi ile araştırılmıştır. Test edilen Quercetin ve LDG'nin tüm konsantrasyonlarda mutajenik hücre frekansını azalttığı ve LDG'nin kızartılmış balık özütleri ile beslenen sıçanlarda %93, kızartılmış et özütleri ile beslenenlerde ise %85 oranında oluşmuş MN'li hücrelerini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca LDG'nin genoprotektif özelliğinin quercetinden daha fazla olduğu da bildirilmiştir (142). Noroozi ve ark. çeşitli flavonoidlerin (LDG, myricetin, quercetin, kaempferol, quercitrin, apigenin, quercetin-3-glucoside, rutin) ve C vitamininin farklı konsantrasyonlarda (6,

23.2, 93 ve 279.4 mmol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenmiş DNA hasarlı hücreler üzerindeki antioksidan etkilerini araştırdıkları bir çalışmada test edilen bütün flavonoidlerin oksidatif DNA hasarını doza bağlı olarak azalttığı ve LDG için DNA hasarının %50'sini azaltan konsantrasyonun 51 µmol/L olarak belirlendiğini bildirilmiştir. LDG'in maksimum antioksidan etki dozunun 279 mmol/L olduğu ve test edilen diğer flavonoidlere göre daha fazla etkin olduğu rapor edilmiştir (154).

Tıbbi bitkilerin antikanserojenik etkileri yaygın çalışılan bir konudur. Yaptığımız çalışmada *P. lanceolata* ekstratı kanser hücresine (Hep-G2) karşı sitotoksik etki göstererek anti-kanserojen etki yapmıştır. Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde *P. lanceolata*'nın 200 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarının komet oluşumunu kontrole göre anlamlı arttığı belirlendi. Yüksek doz bitki ekstratı uygulamasının genotoksik etkisi düşük doza göre daha fazla bulundu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı oluşturulmuş Hep-G2 hücrelerinde ise *P. lanceolata*'nın tüm dozları antijenotoksik etki göstererek DNA hasarlı hücreleri azalttı. Farklı *Plantago* türleri halk tarafından kanser tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. *P. major* ssp. bitkisinin yaprakları kaynatılarak kanser hastalarında kullanılmaktadır (155-157). Yapılan bir çalışmada *P. lanceolata* ve *P. majör* ekstratlarının MCF-7 kanseri hücre hattında ve HUVEC hücrelerinde 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL dozlarının 24 ile 48 saatlik uygulama sonucu doza ve zamana bağlı olarak bitki ekstratlarının MCF-7'de hücre poliferasyonunu önemli derecede baskıladığı, HUVEC hücrelerinde ise hücre poliferasyonunu az miktarda baskıladığı bildirilmiştir (158). *P. lanceolata* ekstratlarının bazı kanser hücrelerinin (HeLa, MCF7 ve HT-29) büyümesini engellediği ve anti kanserojen etki gösterdiği bildirilmiştir (23). Bir başka çalışmada kolon kanser riskini azaltıcı faktörler için bir çalışma yapılmış ve bunun sonucunda egzersiz, aspirin ve *Plantago ovata* ekstratların kullanımı kolon kanserini azalttığı bildirilmiştir (159). Uluslararası kanser enstitüsü tarafından yayınlanan bir çalışmada *Plantago* ekstratlarının MCF-7 ve UACC-62 (melanoma) hücre hatları üzerinde hücre gelişimini baskılayarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (160). Bir diğer çalışmada dört farklı bitkinin yaprak ve tohumlarından elde edilen ekstratlar 2 ve 4 mg/ml konsantrasyonlarda Beas-2B A-549, DU-145, CCC-221, K-562, MCF-7 ve PC-3 hücre hatlarına uygulanmış ve hücre canlılık testleri kullanılarak sitotoksik etkileri incelenmiştir. MTT sonucunda *P. major* tohumundan elde edilen özütün A-549 hücresinde %78, DU-145 hücresinde %28 ve yaprak özütünün ise DU-145 hücresinde %38 oranında doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. MCF-7

hücrelerinde ise yaprakdan elde edilen ekstratlarda herhangi bir etki görülmezken tohum ekstratlarında hücre poliferasyonunda %38 oranında artış görülmüştür. Normal hücre hattı olan Beas-2B hücresinde ise sitotoksik etki görülmediği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre bitkilerin ekstre edilen kısımlarına ve uygulama dozuna bağlı olarak sitotoksik etkiler farklılık göstermiştir (161). Ozaslan ve ark. tarafından Ehrlich ascites karsinomlu farelerde (Balb/C Mus musculus) yapılan *in-vivo* bir çalışmada 25, 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda *P. major* yaprak ekstratlarının tümörün genişlemesini engellediği gösterilmiştir (162). Başka bir çalışmada ise aynı hayvan modelinde *P. major*'ün %1, %2 ve %3'lük konsantrasyon ekstraktları, 0.1 ml/gün dozunda 10 gün boyunca uygulanmış özellikle %1 konsantrasyonun kanser gelişiminde baskılayıcı etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (163). Bu çalışmaların aksine bir başka çalışmada HeLa hücrelerinde *P. major spp.* ve çeşitli bitki ekstratlarının 1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığını %50'den daha fazla azaltmadığı böylece *P. major*'ün ekstratlarının HeLa kanser hücrelerinde sitotoksik olmadığı bildirilmiştir (164).

Çalışmamızda LDG'nin uygulanan tüm dozları Hep-G2 hücrelerinde komet oluşumunu önemli oranda artırmış ve sözkonusu kanser hücrelerinde genomik kararsızlığa neden olarak genotoksik etki göstermiştir. Bu etki minimal doz uygulamasında diğer dozlara göre daha fazla bulunmuştur. LDG'in DNA hasarlı HepG2 hücrelerine kombine uygulamasında ise, sadece LDG'in minimal doz grubu % DNA<sub>T</sub> ve Tail moment parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan DNA hasarını önemli ölçüde azalttı.

Yaptığımız çalışmaya benzer bir çalışmada Horváthová ve ark. Quercetin ve LDG'in üç farklı konsantrasyonunun (20, 50 ve 100 µmol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı potansiyel DNA koruyucu etkilerini komet testi ile insan melanom HMB-2 hücrelerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Quercetin ve LDG'in DNA hasarının önemli ölçüde arttırmadığı, her iki flavonoidin de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu aktivite sergiledikleri saptanmıştır. Quercetin koruyucu etkisi en düşük dozu için %40 iken, en yüksek dozu için %80'dir. LDG'in koruyucu etkisi ise en düşük dozu için %59 olup en yüksek dozu için %75'tir. Quercetin ve LDG'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in oluşturduğu DNA hasarına karşı serbest radikalleri süpürmek suretiyle koruyucu bir aktivite sergiledikleri düşünülmektedir (165). Diğer bir çalışma ise Ramos ve ark. LDG ve Ursolik asitin Caco-2 hücrelerinde DNA tamiri ve DNA koruma üzerine etkilerini komet testi kullanarak incelemişlerdir. LDG (20 µM) ve ursolik asit (5 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından

indüklenen DNA zincir kırıklarını uzun süreli uygulamada azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca ön muamele uygulaması sonucunda LDG (10 µM) veya ursolik asit (5 µM) DNA iplik kırıklarının onarımını artırdığı gözlenirken, geç muamele uygulamasında böyle bir etki görülmemiştir. Elde edilen bu sonuç tamir aktivitesinin başlatılmasında LDG veya ursolik asit ve tamir enzimleri arasında doğrudan bir etkileşim olmadığını düşündürmüştür. Ayrıca LDG ve ursolik asitin baz oksidasyonu üzerine etkilerini saptamak amacıyla hücrelere 8-OxoGuanin teşviki için fotosensitizör Ro 19-8022 ve görünen ışık uygulanmıştır. LDG'in kısa süreli inkübasyon periyodu için CaCo-2 hücrelerini bu hasara karşı koruduğu gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde LDG ve ursolikasitin Caco-2 hücrelerinde DNA'yı hem oksidatif hasara karşı koruduğu hem de tamir aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Flavonoidler ve triterpenoidler gibi fitokimyasallar kanserli hücrelerde enzimatik ve nonenzimatik hücrel antioksidan aktivitelerini düzenlemek suretiyle antioksidan olarak hareket edebildikleri bildirilmiştir (166). Başka bir çalışmada ise Quercetin ve LDG'nin klastojenitelerini ve maling melonom tedavisinde kullanılan melphalanın oluşturduğu hasara karşı etkilerini insan melanom HMB-2 hücrelerinde kromozomal anormallik testi ile inceleme yapmışlardır. Quercetin'in total kromozomal anomalisi 20 ve 50 µmol/L, LDG de ise 10 ve 20 µmol/L konsantrasyonlarda pozitif kontrole göre önemli ölçüde azaltmıştır. Quercetin'in, anormal metafaz yüzdesi ise 50 µmol/L, LDG den 20 µmol/L konsantrasyonları pozitif kontrole göre azalttığı belirlenmiştir. Her iki flavonoid için melphalan gibi sitotoksik etkileri olan ilaçlara karşı hücreleri kromozomal hasarlardan koruduğunu ifade etmişlerdir (165).

Çalışma sonuçlarına göre LDG'in DNA onarım mekanizmalarını aktive ederek veya DNA hasarına yol açabilecek serbest radikal oluşumlarını engeleyerek veya bu radikalleri süpüren sistemleri çalıştırarak antimitojenik ve genoprotektif potansiyelini gösterdiğini düşünüyoruz. Bunun nedeni LDG'in yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğunun çok sayıda çalışma ile ortaya konmuş olmasıdır. LDG'in birçok deney modelinde reaktif oksijen türevleri (ROT tarafından indüklenen lipid, DNA ve protein hasarını önlediği bulunmuştur (49, 166). LDG'nin antioksidan özelliğinin altında birden çok mekanizma bulunmaktadır. LDG kimyasal yapısı nedeniyle hidroksil gruplarından bir hidrojen atomunu serbest radikallere verebilir, M-elektron sistemi etrafında bulunan çiftlenmemiş elektronları çekebilir, bu sayede ROT süpürücü olarak işlev görebilir. LDG antioksidan etkisini hücrel bileşenlerin oksidasyonunu katalizleyen enzimleri inhibe

ederek de gösterebilir. Ayrıca LDG glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi endojen antioksidanları koruyarak veya bu antioksidanları arttırarak antioksidan etkisini uygulayabilir. Son olarak LDG, ROT oluşumundan sorumlu olan geçiş metali iyonlarını şelatlayabilir ve dolayısıyla lipoksijenaz reaksiyonunun önlenmesine veya geçiş metallerine bağlı olmayan oksidasyonun baskılanmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra LDG'in bloke edici etkisinin desmutajenik hareketinin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. LDG ile yapılan bazı çalışmalarda LDG'in DNA tamir mekanizmalarını aktif hale getirebildiği de gösterilmiştir (49, 166). Bu nedenle LDG bir biyo-antimutajen olarak da hareket etmiş olabilir.

Bir flavonoid türevidir olan LDG'in antikanserojen özelliklerine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. LDG anti-kanser özellikte bir flavonoid bileşiği olup kanser hücrelerinin poliferasyonunu ve migrasyonunu azaltıp apoptozu indüklemektedir (46, 167). LDG'in farklı kanser hücre hatlarında antikanserojen aktivitesinin değerlendirildiği birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda LDG'in farklı malignansi tiplerine karşı güçlü bir antikanser ajanı olarak hareket ettiği görülmüştür. Özellikle karaciğer, akciğer, göğüs, özofagus, skuamöz hücreli karsinom, kolon, prostat ve cilt kanserlerine karşı anti-kanserojen etkisi belirlenmiştir (46, 167-169). LDG kanser hücrelerinin proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenezi baskılayıp apoptozu indükler. Ayrıca LDG sitotoksitesini indükleyerek farklı tipteki kanser hücrelerinde apoptoz yolaklarını uyarır. Özellikle LDG'in kan-beyin bariyerini geçebilmesinin, beyin kanserini içeren merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için kullanımına uygun olduğu şeklinde düşünülmektedir (49).

Zang M. ve ark. tarafından yapılan çalışmada insan gastrik kanser (GC) hücreleri üzerinde LDG'in 24 saatlik uygulamasında GC hücrelerinin koloni oluşturabilme ve proliferasyon yeteneklerini doza bağımlı olarak önemli derecede inhibe ettiği bildirilmiştir (59).

Bir başka çalışmada ise farelerin deri altına MKN28 hücreleri enjekte edilip deri kanseri modeli oluşturulmuş akabinde LDG uygulanarak kanser gelişim parametreleri takip edilmiştir. LDG verilen farelerde tümör büyüklüğü ve ağırlığında azalma gözlenmiş böylece LDG'nin kanser tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (58). Benzer bir başka çalışmada LDG'nin Parkinson hastalığındaki etkisini belirlemek için SH-SY5Y hücrelerine MP<sup>+</sup> uygulanarak Parkinson semptomları oluşturulan hücrelerde LDG'nin Bcl-2/Bax oranını artırdığı, Kaspaz 3'ün ifadesini baskılayarak apoptozu engellediği ve

hücre canlılığını artırarak Parkinsona bağlı hücre ölmünü azalttığı bildirilmiştir (170). Diğer bir çalışmada ise Lee J. ve ark. MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, LDG'nin yüksek dozlarının (20 ve 40 µM) kanser hücrelerinde toksik etki gösterirken düşük dozların etkisinin olmadığı ayrıca kanser hücrelerinde Bax ekspresyonunu artırıp Bcl-xL ekspresyonunu baskılayarak hücreleri apoptoza yönlendirdiği rapor edilmiştir (171)

Danışman F. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise lösemi hücre kültürlerinde apigenin, LDG ve sinensetin lösemide kullanılan ilaç ile kombine uygulanarak hücre proliferasyon kinetikleri ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Lösemi hücrelerine apigenin, LDG ve sinensetin 25-200 µM arasındaki dozlarda sitotoksik aktivite gösterdiği ayrıca sırasıyla %50.21, %48.17, % 58.95 ve %0.17 oranlarında apoptotik etkileri olduğu bildirilmiştir. Sonuçta kronik miyeloid lösemiden korunmada apigenin, LDG ve sinensetin kemoterapötik ajan olarak kullanılabilceği öne sürülmüştür (172). Yapılan diğer bir çalışmada Seo Y. ve ark. PC-3'de LDG'nin sitotoksik ve antikanserojen etkisini incelemişlerdir. LDG PC-3 hücrelerinde proliferasyondan sorumlu kalsiyum ile aktive edilen klor kanallarını inhibe ederek ve ubikitin aracılı hücre dışı matriks proteinlerin parçalanmasını azaltarak kanser hücrelerinin metastasını ve invazyonunu engellediği rapor edilmiştir (173). Benzer şekilde Lin T. ve ark. LDG'nin A431-III ve A431-P hücrelerinde UBE2S protein seviyesinin azaltarak hücre dışı matriks proteinlerin parçalanmasının azalmasına neden olarak rahim kanseri hücrelerinin migrasyon yeteneğini azalttığı bildirilmiştir (174).

*Cynara syriaca* bitkisinden elde edilen altı farklı fenolik bileşiğin (caffeic asit, apigenin, apigenin-7-glikozit, LDG, LDG-7-glikozid ve cynarin) akut lenfoblastik lösemili hastalarından alınan blastik hücreler ve lösemik hücre hatları (DG75, B95, BB58, K562) üzerindeki sitotoksik etkileri altı farklı konsantrasyonda test edilmiş ve cynarin ve caffeic asitin standardize edilmiş hücre dizileri üzerindeki sitotoksikite oranlarının proliferasyon oranlarından daha düşük olduğu bununla birlikte cynarin'in akut lenfoblastik lösemi hastalarından izole edilen lenfositlerde sitotoksik etkisinin proliferatif etkisinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (175).

Başka bir çalışmada ise insan miyelojen lösemi hücrelerinde (K562) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı quercetin, rutin, LDG ve apigenin koruyucu etkileri komet testi ile değerlendirilmiştir. 20-100 µmol/l konsantrasyon aralığında LDG'nin DNA hasarını %44, Quercetin'in ise %42 oranında önlediği saptanmıştır.



Rutin'in koruyucu etkisinin (100 ve 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) oldukça düşük (%8-10) olduğu, Apigenin ise DNA tek zincir kırıkları üzerinde koruyucu bir etki sergilemediği görülmüştür.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin neden olduğu DNA hasarına karşı en güçlü inhibisyonun LDG tarafından sağlandığı belirtilmektedir. Buna göre LDG ve Quercetin'in DNA'yı oksidatif ataklardan korumada daha etkili oldukları öne sürülmektedir (176).

Kanser hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı tümör hücrelerinin apoptozunda önemli rol oynamaktadır. Bir çalışmada GC hücrelerine 10 ve 30  $\mu\text{M}$  LDG uygulaması sonucu Akt (Ser-473) fosforilasyonunu kontrol grubuna göre azaltığı, apoptotik Hs-746T ve MKN28 gen ifadelerinin ise doza bağımlı olarak arttığı gösterilmiştir. Epiteyal-Mezanşimal Dönüşüm (EMT) olayı kanser hücrelerinin invazyonu ve migrasyonunda önemli rol oynayan mekanizmalardan biridir. LDG'nin GC hücrelerinde F-aktinleri parçalanmasını hızlandırarak hücre iskeletinin dağılmasına dolayısıyla mezenşimal fenotip göstermesine neden olabildiği ayrıca Notch 1 sinyal yolağını inhibe ederek EMT'yi geri çevirdiği böylece hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneğini azattığı bildirilmiştir. LDG'nin bu mekanizmalardaki rolü epitelyal biomarkerlerden E-Kadherini azaltıp mezenşimal biomarkerlerden N-Kadherin ve Vimentin artırarak ayrıca Notch1, siklin-D1 ve Hes-1'in gen ifadelerini azaltarak yaptığı düşünölmektedir. LDG'in antikanserojen etkisine ek olarak antitümör etkisi de bulunmaktadır (58).

Pek çok çalışma LDG'in hem topoizomeraz I hem de topoizomeraz II'yi inhibe ettiğini bildirmiştir (177). Örneğin; LDG'in 5  $\mu\text{M}$  dozunun sıçan karaciğerinde topoizomeraz I'in katalitik aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (178). Yapılan bir başka çalışmada ise LDG ve quercetin'in 30–80  $\mu\text{M}$  doz aralığında Çin hamster ovaryum AA8 hücrelerinde topoizomeraz II aktivitesini önlediği saptanmıştır (177). Diğer bir çalışmada ise myricetin, quercetin, fistein, LDG, daidzein, biochanin A, kaempferol, galangin ve chrysin gibi flavonoidlerin 50  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda topoizomeraz II'ye zarar verdiği bildirilmiştir (179). Tüm bu çalışmalara göre LDG'in topoizomeraz II aracılığı ile DNA hasarını indükleyebildiği gösterilmiştir. LDG'in topoizomeraz II sayesinde neden olduğu DNA hasarının kanser hücrelerinin ölüme yol açması bakımından kullanışlı olabileceği iddia edilmektedir. (145).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, halk arasında geleneksel olarak tıbbi amaçlarla kullanılan *P. lanciolata* bitki ekstratı ile bu bitkinin önemli bileşenlerinden olan LDG flavonoidinin antigenotoksik özellikleri insan lenfosit hücrelerinde ve antikanserojen özellikleri ise HepG2 hücrelerinde araştırıldı.

Literatür verileri ve bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bir araya getirildiğinde *P. lanceolata* bitkisinin metanol ekstraktı ile LDG flavonoidinin genotoksik olmadıkları aksine DNA hasarlı hücrelerde doza bağlı olarak genoprotektif etki gösterdikleri kanser hücrelerinde ise muhtemelen antioksidan mekanizmalar aracılığı ile veya hücre transformasyon mekanizmalarındaki önemli makromoleküllerin etkileşimini bloke ederek antikanserojenik özellikler gösterdiği ortaya kondu. Çalışmadan elde edilen sonuçların geçerliliği kullanılan hücre tipleri ve test maddelerinin uygulama dozları ile sınırlıdır. *P. lanceolata* ve LDG'nin genotoksisite/antigenotoksisite ve kanserojenite/antikanserojenite potansiyellerine ilişkin daha fazla bilgi edinebilmek için farklı dozlarda ve farklı hücre tiplerinde çalışılması önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Baytop T. Türkiye’de bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün). İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 40, İstanbul 1984, 20: 20–3.
2. Ebringerova A, Kardosova A, Hroma’dkova Z, Hrzı’balova’ V. Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from european herbaceous plants. *Fitoterapia* 2003, 74(1-2): 52-61.
3. Fons F, Gargadenec A, Gueiffier A, Roussel JL. and Andary C. Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *P. lanceolata*. *Phytochemistry* 1998, 49: 697-702.
4. Harput US, Genc Y and Saracoglu I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50: 1554-9.
5. Rumball N, Keogh RG, Kane GE, Miller JE, Claydon RB. “Grassland Lancelot” Plantain (*P. lanceolata*L.). *N. Z. J. Agric. Res* 1997, 40: 373-77.
6. Pieroni A, Nebel S, Quave C, Muñnz H, Heinrich M. Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbe’reshe’ of the Vulture area in southern Italy. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 81: 165-85.
7. Moore G, Sanford P, Wiley T. Perennial pastures for Western Australia, *Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth 2006.*
8. Stewart AV. Plantain (*P. lanceolata*) – a potential pasture species. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 1996, 58: 77-86.
9. Tutel B, Kandemir I, Kufi S, Kence A. Classification of Turkish *Plantago* L. species using numerical taxonomy *Turk. J Bot* 2005, 29: 51-61.
10. Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L, Metzler M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicol Lett* 2005, 158(1):72-86.
11. Tourkey M. Molecular targets of luteolin in cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 2016, 25(1): 65–76.
12. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ, Alvur M. DNA hasarı analizinde  $\mu$ -FADU ve komet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2004, 2 (3): 97-103.

13. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major*. A review. *J. Ethnopharmacol* 2000, 71: 1-21.
14. Davis PH. The flora of Turkey and the east aegean Islands. Edinburgh at the University Press 1982, 7.
15. Herbalism. Wild crafting & Permaforestry <https://dspermaculture.wordpress.com/2015/04/17/narrowleaf-plantain-plantago-lanceolata/> 29 Aralık 2018.
16. Heathcote RL. Australian Geographical Studies: Volume III, April, 1965, Number 1.
17. Bassett IJ, Crompton CW. Pollen morphology and chromosome numbers of the family Plantaginaceae in north America. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* 1968, 46: 349-61.
18. Koçak SM. Sinirli Ot (*P. lanceolata*L.) Bitkisinin Çözücü Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Fen Bilimleri Enst, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniv. 2011.
19. Emlock Lily's Digital Herbarium. <https://hemlocklily.wordpress.com/2013/06/06/plantain-plantago-major-broad-leafed-or-plantago-lanceolata-narrow-leafed/> 29 Aralık 2018.
20. Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. *Plantago major* L. *P. lanceolata* L. (Plantaginaceae). *Phytotherapie* 2008, 6: 367–71.
21. Fleer H, Verspohl EJ. Antispasmodic activity of an extract from *Plantagolanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine* 2007, 14: 409–15.
22. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antivir Res* 2002, 5: 53–62.
23. Beara IN, Lesjak MM, Orcic DZ, Simin ND, Simin DC, Bozin BN. and Dukic NMM. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *P. lanceolata* L. *Food Science and Technology* 2012, 47: 64-70.
24. Mascolo N , Autore G , Capasso F , Menghini A , Fasulo MP. Biological screening of Italian medicinal plants for anti- inflammatory activity. *Phytotherapy Research* 1987, 1(1): 28-31.
25. Herold A, Cremer L, Calugaru A. Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 2003, 62: 117-29.

26. Fakhrudin N, Astuti ED, Sulistyawati R, Santosa D, Susandarini R, Nurrochmad A. and Wahyuono S. n-Hexane insoluble fraction of *Plantago lanceolata* exerts anti-inflammatory activity in mice by inhibiting cyclooxygenase-2 and reducing chemokines levels. *Scientia Pharmaceutica* 2017, 85: 12.
27. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on *Plantago lanceolata* L. folium. *European Medicines Agency* 25 November 2010.
28. Yesilada E, Honda G, Sezik E vd. Traditional medicine in Turkey. IV. Folk medicine in the mediterranean subdivision. *J Ethnopharmacol* 1993, 39(1): 31-8.
29. Melese E, Asres K, Asad M. and Engidawork E. Evaluation of the antipeptic ulcer activity of the leaf extract of *Plantago lanceolata* L. in rodents. *Phytother* 2011, Res. 25: 1174–1180.
30. Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 2013, 12(8):620-36.
31. Mcnaught AD, Wilkinson A, IUPAC. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids) (2 ed.), Oxford: *Blackwell Scientific* 1997.
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure anti-oxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med* 1996, 20: 933-56.
33. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* 2002, 36: 1199-208.
34. Kahraman A, Serteser M, Koken T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2002, 3: 1-8.
35. Chen Y, Zheng R, Zhongjian J, Yong J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radicals Biol. Med* 1990, 9: 19-21.
36. Feredioon S, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1992, 32(1): 67–103.
37. Hertog MGL, Hollman Content of potentially PCH, Putte B. anticancerogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem* 1993, 41: 1242-1246.
38. Nam TW, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Park JY. And Kim YK. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits migration through a MAPK-dependent mechanism in osteoblasts, *J. Bone Miner. Metab* 2008, 26: 551–60.

39. Lefort EC. and Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Mol. Nutr. Food Res* 2013, 57: 126–44.
40. Middleton E, Kandaswami JC. and Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev* 2000, 52: 673–751.
41. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* 2008, 52: 507–26.
42. Lin Y, Shi R, Wang X, and Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 2008, 8(7), 634-646.
43. Aruoma O. I, Cuppett S. L. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. *AOCS Press, Champaign, Illinois* 1997, 241.
44. İnal ME and Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000, 1(3): 21-9.
45. Yuksel S, Yesilada E, Gulbay G, Kurtoglu E, Savaci SS. Protective effect of myricetin against estradiol-17 $\beta$ -induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Fresenius Environmental Bulletin* 2012, 21(4a): 1022-1026.
46. Pandurangan AK, Esa NM. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways. A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15(14): 5501.
47. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. DNA Polymerases Require a Template and Primer. In *Biochemistry* (5th ed. section 27.2.4). New York, NY: W. H. Freeman, 2002.
48. Miguel LN. Distribution and biological activities of luteolin. *Med Chemistry* 2009, 9:(1): 31-59.
49. Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM. and Kouretas D. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50(6): 2155-70.
50. Tsai YD, Chen HJ, Hsu HF, Lu K, Liang CL, Liliang PC. and Houn JY. Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2013, 44(6): 837-45.
51. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000, 55: 481–504.

52. Lopez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 2009, 9(1): 31–59.
53. Liao P-H, Hung L-M, Chen Y-H, Kuan Y-H, Zhang F. B-Y, Lin R-H, Shih H-C, Tsai S-K, Huang S-S. Cardioprotective effects of Luteolin during Ischemia – reperfusion injury in Rats. *Circ J* 2011, 75: 443-50.
54. Wang GG, Lu XH, Ding M, Tang WT, Li W, Zhao X, Zhang C. Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/reperfusion. *Sheng Li Xue Bao*. 2011 Apr 25, 63 (2): 177-83.
55. Nabavi SF, Braidy N, Gortzi O, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Skalicka-Woźniak K, Nabavi SM. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res Bull* 2015, 119(Pt A): 1-11.
56. Zhu LH, Bi W, Qi RB, Wang HD, Lu DX. Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int J Neurosci*. 2011 Jun, 121 (6): 329-36.
57. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology* 2005 Jul, 115 (3): 375-87.
58. Ziyang L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med* 2007 Mar, 73 (3): 221-6.
59. Zang M, Hu L, Fan Z, Wang H, Zhu Z, Cao S, Wu X, Li J, Su L, Li C, Zhu Z, Yan M. and Liu B. Luteolin suppresses gastric cancer progression by reversing epithelial-mesenchymal transition via suppression of the Notch signaling pathway. *J Transl Med* 2017, 15: 52.
60. Wruck CJ, Claussen M, Fuhrmann G, Römer L, Schulz A, Pufe T et al. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl* 2007, (72): 57-67.
61. Ise R, Han D, Takahashi Y, Terasaka S, Inoue A, Tanji M, et al. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Lett* 2005, 579: 1732–40.
62. Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr. Cancer* 2000, 38: 116–20.

63. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res* 1998, 4: 1055–64.
64. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr. Cancer* 2001, 39: 139–47.
65. Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res* 1993, 53: 1328–31.
66. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol* 2001, 61: 1205–15.
67. Lim do Y, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292: 66–75.
68. NCBI. What is DNA repair? <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/>. 22 Aralık 2018.
69. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. DNA polymerases require a template and primer. In *Biochemistry* (5th ed. section 27.2.4). New York, NY: W. H. Freeman, 2002.
70. Schlacher K, Goodman MF. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007, 8: 587-94.
71. Klug WS, Cumming MR, Spencer CA. *Genetik Kavramlar*, 2. Baskı, Ankara 2011: 377-82.
72. Kurtoğlu EL, Tekedereli İ. DNA onarım mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2015, 4(3): 169-77.
73. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003, 531(1-2): 231-51.
74. Choy WN. “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, Marcel Dekker, New York, 2001, 29-187.
75. Vural N. “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 2005, 115-29.



76. Mortelmans K, Rupa SD. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Adv Appl Microbiol* 2004, 56: 379-401.
77. Zeiger E. History and rationale of genetic toxicology testing: An impersonal, and sometimes personal. *Environ Mol Mutagen* 2004, 44: 363-71.
78. Purchase IFH, Longstaff E, Ashby J, Styles JA, Anderson D, Lefevre PA, Westwood FR. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *Brit J Cancer* 1978, 37: 873-959.
79. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volder M. Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006, 88: 1515-31.
80. Mavournin HK, Blakey HD, Cimino CM, Salamone FM, Heddle AJ. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990, 239: 29-80.
81. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* 2003, 140-1: 63-74.
82. Preston RJ, Au W, Bender MA, Brewen JG, Carrano AV, Heddle JA, McFee AF, Wolff S, Wassom JS, Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1981, 87: 143-88.
83. Jena GB, Kaul CL, Ramarao P. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology* 2002, 34: 86-99.
84. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Sram RJ, Kunudsen L, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 2006, 600 (1-2): 37-45.
85. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hugmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Suhaker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000, 463: 11-172.
86. Carrano AV, Natarajan AT. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988, 204: 379-406.
87. Latt SA, Sehrek RR, Loveday KS, Dougherty CP, Schuler CF. Sister chromatid exchange. *Adv Hum Genet* 1980, 10: 267-331.

88. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* 1995, 33 (12):1061-1080.
89. Wilson DM, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 2007, 616: 11–23.
90. Topaktaş M, Rencüzoğulları E, “Sitogenetik”, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010; 87-91.
91. Topaktaş M, Speit G, Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn. *Tr J Biol* 1990, 14: 69-78.
92. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik Toksikite Testleri. *TUBAV Bilim Dergisi*, 2011, 4 (3): 221-9.
93. Demirel S, Zamani A. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi* 2002, 12 (3): 123-27.
94. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990, 244: 95-103.
95. Stoper H, Müller OS. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro* 1997, 11: 661-7.
96. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The in vitro micronucleus test: A multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction. *Mutat Res* 1997, 392 (1-2): 19-30.
97. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000, 455: 155-66.
98. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986, 161: 193-8.
99. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007, 1084 – 104.
100. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 123 (11): 291–8.
101. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175: 184-91.

102. Çelik A, Mazmanci B, Çamlica Y, Çömelekoğlu Ü, Aşkın A. Evaluation of cytogenetic effects of lambda-Cyhalothrin on wistar rat bone marrow by gavage administration. *Environ Safe* 2005, 61: 128–33.
103. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MPA, Collins, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. *Mutat Res* 1993, 288: 47-63.
104. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi İle DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Komet Analiz Yöntemi HR. *Ü.Z.F. Dergisi*, 2010, 14(2): 77- 89.
105. Sigma Aldrich. Luteolin 7-O-β-D-glucoside. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/74284?lang=en&region=TR> 22 Aralık 2018.
106. G-BIOSCIENCES. DMSO. <https://www.gbiosciences.com/DMSO> 25 Aralık 2018.
107. Wikipedia. EDTA. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3c/EDTA.svg/1200px-EDTA.svg.png> 22 Aralık 2018.
108. Amazon. Tris-hidroklorid. <https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/product/large/2670.jpg> 24 Aralık 2018.
109. Sigma Aldrich. EtBr. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/138/mfcd00011724.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00011724-medium.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/138/mfcd00011724.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00011724-medium.png) 22 Aralık 2018.
110. Okimya. Hidrojen Peroksit. <https://okimya.com/wp-content/uploads/2018/02/H%C4%B0DROJEN-PEROS%C4%B0T-MOLEK%C3%9CL-YAPISI.png> 20 Eylül 2018.
111. Harutyunyan K, Balayan K, Tadevosyan G, Hayrapetyan M, Musayelyan R, Grigoryan R, et al. Genotoxic potential of selected medicinal plant extracts in human whole blood cultures. *J Herbmед Pharmacol* 2019, 8(2): 160-2.
112. Lüleci G, Sakızlı M. Renkli Genetik Atlası (Ed 4). Nobel Tıp Kitabevleri; İstanbul. 2009, 176-208.
113. Speit G, Haupter S. On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum. Genet* 1985, 70: 126-9.
114. Gerster JL. A Cytogenetic study of factors affecting sister chromatid differentiation in vicia faba and hordeum vulgare. *Cytologia* 1988, 523-37.

115. Çeker S. Ektoinin insan lenfosit hücrelerinde genotoksik potansiyeli. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg* 2018, 8(1): 317-23.
116. Saraç BE. Investigation Of In Vitro Cytotoxic Effects Of Heparin Coated Iron Oxide Nanoparticles Combined With Tpp-Dca On Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hepg2 A Thesis Submitted To The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of Middle East Technical University In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Master Of Science In Biology June 2018.
117. Nagla ZIE, Mahmoud FM and Ayman MA. Mitomycin-C induced genotoxic Effect in lymphocytes and histological alterations in testes of male albino mice. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 2016, (62): 18 – 27.
118. Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S. and Williams FM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Al-Fateh University for Medical Sciences. *Citation: Libyan J Med* 2010, 5: 4637.
119. Helma C. Uhl MA. Public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2000, 466 (1): 9-15.
120. Lerda D, Biaggi BM, Peralta N, Ychari S, Vazquez M. and Bosio G. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2005, 43(5): 691-8.
121. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: Damage To DNA And Its Consequences. In L. Andreas (1.Eds), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Germany, Birkhäuser 2009, 87-110.
122. Suspiro A, Prista J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicology Letters* 2011, 207(1): 42-52.
123. Henderson L, Jones E, Brooks T, Chetelat A, Ciliutti P, Freemantle M, Howard CA, Mackay J, Phillips B, Riley S, Roberts C, Wotton AK, Waart EJ. Industrial genotoxicology group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies. *Mutagenesis* 1997, 12 (3): 163-7.
124. Mahadevan B, Snyder RD, Waters MD, Benz RD, Kemper RA, Tice RR. and Richard AM. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2011, 52(5): 339-54.

125. Salama SA, Serrana M. and Au WW. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 1999, 436(1): 99-112.
126. Beg T, Siddique YH, Ara G, Gupta J. and Afzal M. Protective action of EGCG against anticancer drugs MMS and CP. *Journal of Pharmacology* 2009, 6 (2): 1-7.
127. Benkovic V, Orsolich N, Knezevic AH, Ramic S, Dikic D, Basic I. and Kopjar N. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2008, 31 (1): 167-72.
128. Klaunig JE, Kamendulis LM. and Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 2010, 38 (1): 96-109.
129. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 2012, 70 (5): 257-65.
130. Lakshmi SB, Rudrama DK, Madhavi D. Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Journal of Environmental Biology* 2007, 30 (5): 663-6.
131. Wilmer JL, Erexson GL, Kligerman AD. Effect of Acrolein on Phosphoramidate Mustard-induced Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes. *Cancer Research* 1990, 50: 4635-8.
132. Yuksel S, Tasdemir S, Korkmaz S. Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Bratislava Medical Journal* 2017, 118(4): 208-11.
133. Hayes AW. Principles and methods of toxicology [Elektronik Sürüm]. Taylor and Francis: Boston: *CRC Press* 2008, 354-5.
134. Sasaki MS. Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. *Basic Life Sci* 1980, 15: 285-313.
135. Mansoor K, Qadan F, Schmidt M, Mallah E, Abudayyih W, Matalka K, Stability Study And A 14-Day Oral Toxicity In Rats Of Plantain Leaf Extract (*Plantago lanceolata* L.) *Syrup Scientia Pharmaceutica* 2017, 85: 15.
136. Marques S, Oliveira NG, Chaveca T, Rueff J. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutat Res* 2002, 517 (1-2): 39-46.
137. Stopper H, Schmitt E, Kobras K. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutat Res* 2005, 574 (1-2): 139-55.

138. Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage *Mutat Res.* 2001, 20; 496 (1-2): 171-80.
139. Hadži M, Haveri S, Haveri A, Gali B. Inhibitory effects of delphinidin and LDG on genotoxicity induced by K2(B3O3F4OH) in human lymphocytes in vitro. *Section Cellular and Molecular Biology Biologia* 2015, 70(4): 553-8.
140. Erikel E. In Vitro Test Sistemlerinde Cynarin Ve LDG'in Genotoksik Ve Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Aralık 2014.
141. Erikel E, Yuzbasioglu D, Unal F. Genotoxic and antigenotoxic effects of LDG against MMC-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes in vitro, Gazi University, Ankara, *Turkey Toxicology Letters* 2016, 258S: S62–S324.
142. Taj S, Nagarajan B. Inhibition by quercetin and LDG of chromosomal alterations induced by salted, deep-fried fish and mutton in rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1996, 369 (1): 97-106.
143. Akinrinde AS, Adebisi OE. Neuroprotection by LDG and Gallic acid against cobalt chloride-induced behavioural, morphological and neurochemical alterations in Wistar rats. *Neuro Toxicology* 22 April 2019.
144. Rusak G, Piantanida I, Mašić L, Kapuralin K, Durgo K, and Kopjar N. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions* 2010, 188 (1): 181-9.
145. Orhan F, Gulluce M, Ozkan H, Alpsoy L. Determination of the antigenotoxic potencies of some LDG derivatives by using a eukaryotic cell system, *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 2013, 141: 366–72.
146. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D. and Clement MV. Open Comet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology* 2014, 2: 457-65.
147. Karlsson HL. The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 398 (2): 651-66.
148. Celik AT. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. *A Compendium of Essays on Alternative Therapy* 2012, 233-50.

149. Nofal ZA, El-Maghraby AF, Gad MR, Farghaly AA, Ahmed EM. Evaluation of the protective effect of ethanolic extract of Plantago major Plant Against CCl<sub>4</sub> induced genotoxicity and biochemical disturbance in rat. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences Winter and Spring* 2016, 47 (1): 83-110.
150. Basaran AA, Yu T, Plewa MJ. and Anderson D. An Investigation of some Turkish herbal medicines in salmonella fyphimurium and in the COMET assay in human lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 1996, 16: 125-38.
151. Henn JG, Steffens L, Sperotto NDM, Ponce BS, Verissimo RM, Boaretto FBM, Hassemer G, Péres VF, Schirmer H, Picada JN, Saffi J. and Moura DJ. Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract from leaves of Plantago australis and its major compound, verbascoside. *Journal of Ethnopharmacology* 2018, 229: 145-56.
152. Yuksel S, Sezer SK, Kurtoglu EL, Bag HG. Protective effect of extracts of *Teucrium polium* and *Rumex crispus* against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Ecological Genetics* 2019, 17(2): 93-100.
153. Shen CH, Kuan YH, Lee SS, Yang ML, Kuo HC, and Chiu YW. The protective effect of LDG on cytotoxicity and genotoxicity of bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate in macrophages involved in DNA damage and caspases activation. *Life Science Journal* 2013, 10 (4): 3137-42.
154. Noroozi M, Angerson WJ, and Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998, 67(6): 1210-8.
155. Tuzlacı E and Tolon E. Turkish folk medicinal plants, part III: Şile (İstanbul), *Fitoterapia* 2000, 71: 673-85.
156. Saraç DU, Ethnobotanic features of Rize province, (MSc Thesis, Trabzon: Karadeniz Technical University; Forest Engineering Graduate Program) 2013.
157. Akyol Y. and Altan Y. Ethnobotanic studies in the Maldan Village (Province Manisa, Turkey), *Marmara Pharm J* 2013, 17: 21-5.
158. Daştan S D. Daştan T, Çetinkaya S, Ateşşahin D, Karan T. Evaluation of In Vitro Anticancer Effect of Plantago major L. and Plantagolanceolata L. *Leaf Extracts from Sivas Cumhuriyet Üniv. Sağ. Bil. Enst. Derg* 2016, (1) 1: 07-14.

159. Juarranz M. Calle-Purón M-E. González-Navarro A. Regidor-Poyatos E. Soriano T. Martínez-Hernandez D. Rojas V-D. Guinee V. F. Physical exercise, use of *Plantago ovata* and aspirin, and reduced risk of colon cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 2002, 11 (5):465-472.
160. Gálvez M. Martín-Cordero C. López-Lázaro M. Cortés F. Ayuso M.J. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology* 2003, 88 (2-3): 125-30.
161. Uğur D. Güneş H. Güneş F. Mammadov R. Cytotoxic activities of certain medicinal plants on different cancer cell lines. *Turk J Pharm Sci* 2017, 14 (3): 222-30.
162. Özaslan M, Karagoz ID, Kiliç IH, Cengiz B, Kalender M, Güldür ME, Karagoz A, Zümrüdal ME. Effect of *Plantago major* sapon ehrlich ascitestumoursinmice. *African Journal of Biotechnology* 2009, 8( 6): 955-9.
163. Ozaslan M, Karagöz ID, Kalender ME, Kilic IH, Sari I. and Karagöz A. In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with ehrlich ascites tumor. *The American Journal of Chinese Medicine* 2007, 35 (5): 841-51.
164. Bozkurt-Guzel C, Serbetci T. and Kultur S. cytotoxic activities of some Turkish medicinal plants against Hela cells in vitro. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 2018, 17 (1): 43-9.
165. Horváthová K, Chalupa I, Šebová L, Tóthová D. and Vachálková A. Protective effect of quercetin and LDG in human melanoma HMB-2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2005, 565 (2): 105-12.
166. Ramos AA, Pereira-Wilson C. and Collins AR. Protective effects of Ursolik acid and LDG against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2010, 692 (1): 6-11.
167. Zhou Q, Yan B, Hu X, Li X. B, Zhang J. and Fang, J. LDG inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009, 8 (6): 1684-91.
168. Pandurangan AK, Ganapasam S. LDG modulates cellular thiols on azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Asia Pacific Journal of Experimental Biological Sciences* 2013, 4 (2): 245-50.



169. Hwang JT, Park OJ, Lee YK, Sung MJ, Hur HJ, Kim MS. and Kwon DY. Anti-tumor effect of LDG is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2011, 28 (1): 25-31.
170. Qin L, Chen Z, Yang L, Shi H, Wu H, Zhang B, Zhang W, Xu Q, Huang F, Wu X. LDG-7-O-glucoside protects dopaminergic neurons by activating estrogen-receptor-mediated signaling pathway in MPTP-treated mice. *Toxicology* 2019.
171. Lee J, Park S, Lee J, Chun H, Choi M, Yoon J, Pham T, Kim K.H, Kwon T, Ryu H, Oh S, Yoon D. Differential effects of LDG and its glycosides on invasion and apoptosis in Mda-Mb-231 triple-negative breast cancer cells. *EXCLI Journal* 2019, 18: 1611-2156.
172. Danışman F. Bazı Flavonoid Bileşiklerinin Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde Sitotoksikite ve P-Gp Aktivitesi Üzerine Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi. 2015.
173. Seo Y, Ryu K, Park J, Jeon D, Jo S, Lee HK, Namkung W. Inhibition of ANO1 by LDG and its cytotoxicity in human prostate cancer PC-3 cells. *PLoS ONE January 4* 2017, 12 (3): 1-13.
174. Lin T, Hsu W, Tsai P, Huang Y, Lin C, Chen K, Tsai I, Kandaswami CC, Huang C, Chang G, Leea M. and Cheng C. Dietary flavonoids, LDG and quercetin, inhibit invasion of cervical cancer by reduction of UBE2S through epithelial–mesenchymal transition signaling. *Food & Function* 2017, 19;8(4): 1558-68.
175. Atasever B, Akgün-Dar K, Erdem-Kuruca S, Turan N, Seyhanlı V. and Meriçli A. Cynara syriaca'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2003, 32 (3): 143-50.
176. Horvathova K, Novotný L, Tothova D. and Vachalkova A. Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, LDG and apigenin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated human ML cells K562. *Neoplasma* 2003, 51 (5): 395-9.
177. Cantero G, Campanella C, Mateos S. and Cortés, F. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids LDG and quercetin. *Mutagenesis*, 2006, 21 (5): 321-5.
178. Chowdhury A, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S. and Majumder H. LDG, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal* 2002, 366: 653-61.

179. Bandele O. J, Osheroff N. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$ . *Biochemistry* 2007, 46 (20): 6097-108.



## **EKLER**

### **EK-1. ÖZGEÇMİŞ**

Merve BENZER Elazığ doğumlu olup lisans eğitimini Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2012 yılında tamamladı. 2017 güz döneminde İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.



## EK-2 ETİK KURULU RAPORU

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	DNA hasarına karşı Plantago lanceolata ekstratının ve Luteolin-7-B-D-gligozit'in insan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde iyileştirici etkilerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2018/156

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Şengül YÜKSEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	DNA hasarına karşı Plantago lanceolata ekstratının ve Luteolin-7-B-D-gliozit'in insan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde iyileştirici etkilerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2018/156

DEĞERLENDİRİLE N BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	ILAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/156	Tarih: 06.11.2019					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOLOĞLU						

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU (Başkan)	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıklar	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Barış OTLU	Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet GÜL	Histoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemalettin AYDIN	Genel Cerrahi	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. Hakan HARPUTLUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU  
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	DNA hasarına karşı Plantago lanceolata ekstratının ve Luteolin-7-B-D-gligozit'in insan lenfosit ve Hep-G2 hücrelerinde iyileştirici etkilerinin araştırılması								
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2018/156								
Prof. Dr. Yılmaz TABEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARATAŞ (raportör)	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Dr. Öğr. Üyesi Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji Reanim.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Ecz. Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Hasan KONAN	Sivil Üye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI

*Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun 17.04.2019 tarih ve 66175679-514.99 – E.63800 sayılı YÖK'e yazdığı "Klinik Araştırma İzni" konulu yazısı kapsamına giren çalışmaların başlatılabilmesi için ilgili Kurumdan da izin alınması gerekmektedir.*

Etik Kurul Başkanı  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Seim YOĞLU  
İmza: *[Signature]*

*Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.*