



***LACTOBACILLUS SALIVARIUS* KC27L SUŞUNDAN İZOLE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* GENOTOKSİK VE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ**

Beyza Merve YILDIZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2021

ETİK BEYAN

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

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

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

Beyza Merve YILDIZ

23/06/2021

**LACTOBACILLUS SALIVARIUS KC27L SUŞUNDAN İZOLE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Beyza Merve YILDIZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2021

ÖZET

Ekzopolisakaritler (EPS'ler), ökaryotlar ve prokaryotlar tarafından üretilen makromoleküllerdir. *Lactobacillus salivarius* (*Ligilactobacillus salivarius*) KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakarit (EPS_{KC27L}), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini ve süperoksit anyon radikalini (O^{2•-}) süpürücü aktivitesi ve demir iyonu (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi ile antioksidan özellik gösterir. Bu çalışma, EPS_{KC27L}'nin *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. EPS_{KC27L} (12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/mL), genotoksisite için tek başına ve antigenotoksisite için ise mitomisin-C (MMC; 0,20 µg/mL), metil metansülfonat (MMS; 5,00 µg/mL) veya hidrojen peroksit (H₂O₂; 100 µM) ile eşzamanlı olarak uygulanmıştır. Bu amaçla insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri gerçekleştirilmiştir. EPS_{KC27L}'nin yapısı ve EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamalarından sonra hücrelerdeki değişiklikler taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir. EPS_{KC27L} tek başına KA, KKD, MN ve comet testlerinde önemli bir genotoksik etkiye neden olmamıştır. EPS_{KC27L}'nin tek başına muamelesi, negatif kontrol (distile su) ile karşılaştırıldığında tüm uygulamalarda yalnızca en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) mitotik indeksi (Mİ) önemli ölçüde azaltmıştır. EPS_{KC27L} + MMC uygulaması, pozitif kontrol (MMC) ile karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda KA, KKD ve MN'leri (12,50 µg/mL hariç) önemli ölçüde azaltmıştır. EPS_{KC27L} ayrıca MMS tarafından indüklenen KA, KKD ve MN sıklığını da önemli ölçüde azaltmıştır. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamaları replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksini (NBİ) önemli düzeyde etkilememiştir. EPS_{KC27L}, H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını da anlamlı oranda azaltmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, EPS_{KC27L}'nin genotoksik aktiviteye sahip olmadığını, ancak MMC, MMS ve H₂O₂ mutajenlerine karşı antigenotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamaları SEM'de gözlenen lenfosit ve eritrositlerde önemli değişikliklere neden olmamıştır. Sonuç olarak, EPS_{KC27L}'nin genotoksik ajanlara karşı kemopreventif aktivite sergilediği bulunmuştur. Bu etkinin EPS'nin güçlü antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20316

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus salivarius*, *Ligilactobacillus salivarius*
Ekzopolisakarit, Genotoksisite, Antigenotoksisite

Sayfa Adedi : 140

Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

IN VITRO GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF AN
EXOPOLYSACCHARIDE ISOLATED FROM *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* KC27L
STRAIN

(M. Sc. Thesis)

Beyza Merve YILDIZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2021

ABSTRACT

Exopolysaccharides are macromolecules produced by eukaryotes and prokaryotes. Exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus salivarius* (*Ligilactobacillus salivarius*) KC27L strain (EPS_{KC27L}) demonstrates antioxidant properties including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazase (DPPH) radical and superoxide anion radical (O₂⁻) scavenging activity, and iron ion (Fe²⁺) chelating activity. This is the first study to investigate *in vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of EPS_{KC27L}. EPSK27L (12.50; 25.00; 50.00 ve 100.00 µg/mL) was applied alone for genotoxicity and simultaneously in combination with mitomycin C (MMC; 0.20 µg/mL), methyl methanesulfonate (MMS; 5.00 µg/mL) and hydrogen peroxide (H₂O₂; 100 µM) for antigenotoxicity. For this purpose, chromosome aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN), and comet assays were performed in human peripheral lymphocytes. The structure of EPSK27L and changes in cells after EPSK27L and EPSK27L + MMC treatments were studied using scanning electron microscopy (SEM). EPSK27L alone did not cause a significant genotoxic effect in CA, SCE, MN, and comet tests. Treatment of EPSK27L alone significantly reduced mitotic index (MI) at the highest concentration (100 µg/mL) in all treatments, compared to the negative control (distilled water). Treatment of EPSK27L + MMC significantly decreased CA, SCE, and MN (except 12.50 µg/mL) at all concentrations, compared to positive control (MMC). EPSK27L, also significantly decreased the frequency of CA, SCE and MN induced by MMS. EPSK27L, EPSK27L + MMC ve EPSK27L + MMS treatments did not significantly affect the replication index (RI) and nuclear division index (NDI). EPSK27L also significantly reduced DNA damage induced by H₂O₂. The results of this study show that exopolysaccharide EPSK27L has no genotoxic activity, but it has antigenotoxic activity against MMC, MMS, and H₂O₂ mutagens. EPSK27L and EPSK27L + MMC treatments did not cause significant changes in lymphocytes and erythrocytes in SEM observations. Consequently, EPS was found to exhibit chemopreventive activity against genotoxic agents. This effect is considered to be due to the strong antioxidant properties of EPS.

Science Code : 20316

Key Words : *Lactobacillus salivarius*, *Ligilactobacillus salivarius*,
Exopolysaccharide, Genotoxicity, Antigenotoxicity

Page Number : 140

Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince, hoşgörülü ve sabırlı tavırlarıyla beni her konuda destekleyen, tez konusu seçiminden, tez yazımına kadar her aşamada bilgi ve birikimleri ile yönlendiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bilgi ve görüşlerini esirgemeyen, deneyimleriyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, tez çalışmamın elektron mikroskobu kısmında emeği geçen, büyük bir sabırla her konuda bilgilerini sunan ve yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Prof. Dr. Demet ÇETİN'e, tezimde kullandığım ekzopolisakkaritin üretiminde katkıda bulunan, önerileriyle ve anlayışlı yaklaşımıyla her zaman destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkürü borç bilirim.

Kendilerinden çok şey öğrendiğim, her soruma büyük bir sabırla cevap veren sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU-YILMAZ ve Esra ERİKEL'e, yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Ece AKBAŞ'a ve laboratuvarındaki tüm öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kıymetlerini birkaç kelimedede açıklayamayacağım başta gece gündüz demeden her an yardım etmek için çabalayan ve bana benden çok inanan annem Nermin YILDIZ'a, yardımsever ve hayvansever olmamda etkisi olan babam Mesut YILDIZ'a, iyi ve kötü her anımda yanımda olan, her daim destekleriyle umutlandıran kardeşim Dilara Berna YILDIZ'a, büyük sabırla tüm nazımı çeken Busenur TURGUT'a ve her zaman yanımda olan kedilerime sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Sağladıkları imkanlardan ötürü başta Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e, silah arkadaşlarına, tüm şehit ve gazilerimize minnetlerimi sunarım.

Bu tezin bir kısmı, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından 05/2019-21 No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mikrobiyota	5
2.2. Fonksiyonel Gıdalar	7
2.3. Ekzopolisakkaritler	7
2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları.....	9
2.3.2. Ekzopolisakkaritlerin sağlıkla ilişkisi.....	16
2.3.3. Ekzopolisakkaritlerin olumsuz özellikleri	18
2.4. <i>L. salivarius</i> ve EPS _{KC27L}	19
2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite	22
2.5.1. Kemoprevansiyon	24
2.5.2. Mutajenler.....	25
2.5.3. Genotoksisite testleri	28
2.6. Ekzopolisakkaritler ile Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları	33
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Materyal.....	39

	Sayfa
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal	39
3.1.2. Test materyali	39
3.2. Metot	42
3.2.1. EPS _{KC27L} Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	42
3.2.2. Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testlerinin preparatlarının hazırlanması	42
3.2.3. Mikronükleus (MN) testi preparatlarının hazırlanması	44
3.2.4. Preparatların boyanması	45
3.2.5. Mikroskopik inceleme ve sonuçlarının değerlendirilmesi.....	45
3.2.6. Comet testi	47
3.2.7. İstatistiksel analizler	48
3.2.8. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1. EPS _{KC27L} ’nin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	51
4.1.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi.....	51
4.1.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi	55
4.1.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi.....	57
4.1.4. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkisi.....	58
4.2. EPS _{KC27L} ’nin Mitomisin-C (MMC) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	62
4.2.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi.....	62
4.2.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi	64
4.2.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi.....	66
4.3. EPS _{KC27L} ’nin Metil Metansülfonat (MMS) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	68

Sayfa

4.3.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi.....	68
4.3.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi	71
4.3.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi.....	73
4.4. EPS _{KC27L} 'nin Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	76
4.4.1. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkisi.....	76
4.5. EPS _{KC27L} 'nin Tek Başına ve Mitomisin-C (MMC) ile Birlikte Uygulamasının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	79
5. TARTIŞMA.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	137

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bakteriyel EPS'ler kullanılarak sentezlenen metalik NP'lerin uygulama alanları.	13
Çizelge 2.2. Ticari olarak önemli EPS'lerin özellikleri ve uygulama alanları	14
Çizelge 3.1. İnsan periferik lenfositlerinde EPS _{KC27L} 'nin 48 saatlik muamelesi sonucunda tek donörde belirlenen mitotik indeks (Mİ) değerleri (Çalışılacak konsantrasyonların belirlenmesi için yapılan ön çalışma)	42
Çizelge 4.1. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları	52
Çizelge 4.2. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri.....	55
Çizelge 4.3. EPS _{KC27L} 'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları ile nükleer bölünme indeksi (NBİ).....	57
Çizelge 4.4. EPS _{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ile kuyruk momenti üzerine etkileri.....	59
Çizelge 4.5. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları.....	63
Çizelge 4.6. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri.....	65
Çizelge 4.7. EPS _{KC27L} + MMC'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) ile nükleer bölünme indeksi (NBİ) frekansları.....	67
Çizelge 4.8. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları	69
Çizelge 4.9. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri	72

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. EPS_{KC27L} + MMS'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) ile nükleer bölünme indeksi (NBİ) frekansları.....	74
Çizelge 4.11. EPS_{KC27L} , EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarının kültüre alınmış insan periferel lenfositlerindeki yüzde değişimleri	75
Çizelge 4.12. EPS_{KC27L} + H_2O_2 uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ile kuyruk momentini üzerine etkileri	76
Çizelge 4.13. EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + H_2O_2 uygulamalarının izole insan periferel lenfositlerindeki yüzde değişimleri.....	78

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Antimutajenlerin iki farklı etki mekanizmasının şeması	24
Şekil 3.1. Mitomisin-C'nin yapısal formülü	40
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit'in yapısal formülü.....	41
Şekil 3.3. Metil metansülfonat'ın yapısal formülü	41
Şekil 4.1. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri	52
Şekil 4.2. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları	53
Şekil 4.3. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları	56
Şekil 4.4. EPS _{KC27L} 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri.....	56
Şekil 4.5. EPS _{KC27L} 'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları	58
Şekil 4.6. EPS _{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri.....	59
Şekil 4.7. EPS _{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.8. EPS _{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk momenti üzerine etkileri	60
Şekil 4.9. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri	63
Şekil 4.10. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları...	64
Şekil 4.11. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları	65
Şekil 4.12. EPS _{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri.....	66

Şekil	Sayfa
Şekil 4.13. EPS _{KC27L} + MMC'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları	67
Şekil 4.14. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri	70
Şekil 4.15. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları ..	70
Şekil 4.16. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları	72
Şekil 4.17. EPS _{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri	73
Şekil 4.18. EPS _{KC27L} + MMS'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları.....	74
Şekil 4.19. EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	77
Şekil 4.20. EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk uzunluğu üzerine etkileri	77
Şekil 4.21. EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk momenti üzerine etkileri	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. EPS _{KC27L} , EPS _{KC27L} + MMC ve EPS _{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler	53
Resim 4.2. EPS _{KC27L} , EPS _{KC27L} + MMC ve EPS _{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri için örnek resim.....	57
Resim 4.3. EPS _{KC27L} , EPS _{KC27L} + MMC ve EPS _{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen mikronükleus içeren binükleat hücrelerden örnekler	58
Resim 4.4. EPS _{KC27L} ve EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂ uygulamalarında izole insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarlarından örnekler.....	61
Resim 4.5. EPS _{KC27L} ve EPS _{KC27L} + MMC uygulamalarından elde edilen eritrosit ve lenfositlerin SEM görüntüsü	80
Resim 4.6. EPS _{KC27L} ve EPS _{KC27L} + MMC uygulamalarından elde edilen lenfositlerin SEM görüntüsü	82
Resim 4.7. EPS _{KC27L} 'nin SEM görüntüleri	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
LD ₅₀	%50 Letal doz
M	Molar
mA	Miliamper
mL	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı
V	Volt
μg/mL	Mikrogram/Mililitre
μM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
BN	Binükleat
BrdU	5-Bromo-2-deoksiuridin, Bromodeoksiüridin
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
EPS _{KC27L}	<i>L. salivarius</i> KC27L suşundan izole edilen EPS
EtBr	Etidyum bromür
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KA	Kromozomal anormallik
KA/hücre	Hücre başına düşen kromozom anormalliği
KCl	Potasyum klorür

Kısaltmalar**Açıklamalar****KKD**

Kardeş kromatid değişimi

KKD/hücre

Hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi sayısı

LAB

Laktik asit bakterileri

Mİ

Mitotik indeks

MMC

Mitomisin-C

MMS

Metil metansülfonat

MN

Mikronükleus

MN/hücre

Hücre başına düşen mikronükleus sayısı

NBİ

Nükleer bölünme indeksi

PBS

Fosfat tamponu

Rİ

Replikasyon indeksi

SEM

Taramalı elektron mikroskobu

SH

Standart hata

SSC

Salin sitrat tamponu

UV

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Hipokrat 2400 yıl önce “Besinler ilacınız, ilacınız besininiz olsun” diyerek besinlerin sağlık için oldukça önemli olduğunu belirtmiştir. Günümüzde, bilimsel araştırmalardaki gelişmeler, diyetin beslenme ihtiyaçlarını karşılayabileceği ve bazı hastalıkların tedavisinde yararlı bir rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir (Corbo ve diğerleri, 2014; Huang ve diğerleri, 2019). Fonksiyonel gıda, gıdayı sadece yaşam için değil, aynı zamanda zihinsel ve fiziksel sağlığın kaynağı olarak kullanmayı amaçlamakta, çeşitli hastalıklar için risk faktörlerinin azaltılmasına/önlenmesine veya belirli fizyolojik fonksiyonların geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Lobo ve diğerleri, 2010). Vitaminler, mineraller, antioksidanlar, bitki özleri, lifler, prebiyotikler ve probiyotikler fonksiyonel bileşikler olarak kullanılabilir (Grajek ve diğerleri, 2005; Corbo ve diğerleri, 2014). Probiyotikler, fermente edilmiş fonksiyonel gıdalar geliştirmek için başlangıç kültürleri olarak kullanılabilir. Ayrıca probiyotiklerin fonksiyonel gıdalarla ilişkili sağlık yararları, kısmen ekzopolisakkaritlere (EPS) atfedilmiştir. Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen EPS, umut verici işlevsel rollere sahip önemli bileşenler arasındadır (Nampoothiri ve diğerleri, 2017). Gastrointestinal sistemde kolonileşen bakteri, mantar veya arke gibi mikroorganizmalar ‘mikrobiyota’ olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak, dengeli bağırsak mikrobiyotası insanlara yarar sağlarken, mikrobiyal dengesizlikler metabolik ve bağışıklık aracılı bozukluklarla ilişkilidir. Bağırsak mikrobiyotası ve fonksiyonel gıda bileşenleri arasındaki karşılıklı etkileşimler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olmaktadır (Laparra ve Sanz, 2010; Thursby ve Juge, 2017).

Hücre içinde sentezlenip hücre dışına salgılanan veya hücre duvarına sabitlenmiş enzimler tarafından hücre dışında sentezlenen bakteriyel polisakkaritler, ekzopolisakkaritler (EPS’ler) olarak adlandırılabilir. EPS’ler, olumsuz çevresel koşullara karşı koruma sağlamakta, biyofilm oluşumuna yardımcı olmaktadır. Ayrıca karbon ve enerji rezervi görevi bulunmaktadır. Gastrointestinal sistemde uzun süre kalabilirler ve bu sayede probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu artırabilirler. Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin doğal biyoyumumluluğu ve toksik olmayan doğası, onların çok sayıda tıbbi uygulamada kullanılmasına yol açmıştır. Doku mühendisliğinde, ilaç taşımada ve yara sargısında matris olarak kullanımı, bitkilerden ve mikroalglerden elde edilen polisakkaritlere kıyasla onları daha çekici kılmaktadır (Nwodo ve diğerleri, 2012). Ek olarak, prebiyotik, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, immünomodülatör, antikanser, kolesterol düşürücü, antidiyabetik,

antiülser ve antihipertansif aktiviteler dahil olmak üzere insan sağlığında önemli rollere sahiptirler (Nampoothiri ve diğerleri, 2017). Bakteriyel ekzopolisakaritler, gıda, tıp, eczacılık, kozmetik, tarım, tekstil, inşaat ve petrol sondaj operasyonları da dahil çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Ryan ve diğerleri, 2015).

Lactobacillus cinsi bakteriler GRAS (Genel Olarak Güvenli Tanınan - *Generally Recognized as Safe*) olarak tanımlanan Gram-pozitif, spor oluşturmeyen gıda sınıfı bakterilerdir. Bu bakterilerden elde edilen EPS'ler de GRAS olarak tanımlanmakta ve gıdalarda hukuki açıdan sorunsuz kullanılabilirler (Badel ve diğerleri, 2011). *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae*'nin taksonomileri, genom dizileri, fizyolojik kriterler, organizmanın ekolojisi, klada özgü genler gibi parametreler değerlendirilerek tekrar sınıflandırılmıştır. *Lactobacillus salivarius*'un bu sınıflandırmadan sonraki adı *Ligilactobacillus salivarius* olarak değiştirilmiştir (Zheng ve diğerleri, 2020). 2020 yılında yapılan bu değişiklik nedeniyle daha eski tarihli literatürlerde bakterinin ismi *Lactobacillus salivarius* şeklinde geçmektedir. Tez kapsamında ise *L. salivarius* olarak kullanılacaktır. *L. salivarius*, insanların, kedilerin, hamsterlerin, tavukların ve domuzların ağız ve bağırsak yollarında bulunabilir ve buralardan izole edilebilir. İnsan bağırsak sisteminde en bol bulunan bakterilerden biri olmakla birlikte bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, immün yanıtı uyarma ve gastrointestinal inflamasyonu hafifletme gibi sağlığı geliştirici özellikleri bulunmaktadır (Smithson ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2020).

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkarit (EPS_{KC27L}) antioksidan özelliğini, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi, demir iyonu (Fe⁺²) şelatlama aktivitesi ve süperoksit anyon radikali (O₂⁻) süpürücü aktivitesi ile göstermektedir. EPS_{KC27L}'nin güçlü biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olan *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 üzerine antibiyofilm etkisi de bulunmaktadır. Ayrıca *L. salivarius* KC27L izolatu yüksek EPS üretim miktarlarına sahiptir (Çelik, 2018).

Toksikoloji 'zehir bilimi'dir. Daha spesifik olarak zehirlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile canlı organizmalar üzerindeki fizyolojik ve/veya davranışsal etkilerini inceleyen bilim dalıdır. Biyoloji, kimya, tıp ve farmakolojiyle örtüşen bir disiplindir. Yeterli miktarda alındığında hastalık veya ölüme neden olacak herhangi bir madde zehir veya toksik madde olarak kabul edilmektedir. Anahtar kelime 'yeterli miktar'dır. Doz-cevap ilişkisi

‘toksikolojinin babası’ olarak anılan ve on altıncı yüzyıl doktorlarından olan Paracelsus’a atfedilmektedir. Vücudun bu kimyasallara verdiği tepkinin alınan doza bağlı olduğunu belgelemiştir. Çalışmaları, bir maddenin düşük dozlarının zararsız ve hatta faydalı olabileceğini, daha yüksek dozların ise toksik olabileceğini ortaya koymuştur. Paracelsus bu durumu “Her şey zehirlidir. Sadece doz, bir şeyin zehir olup olmadığını belirler” öngörüsü ile açıklamıştır (Langman ve Kapur, 2006; Grandjean, 2016; Shaheen ve diğerleri, 2018).

Genetik toksikoloji, fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların genetik materyalle etkileşimini, hasara tepki mekanizmalarını ve organizmalar üzerindeki etkilerini inceleyen multidisipliner bir bilimdir (López-Romero ve diğerleri, 2018). Mutajenler, genotoksik karsinojenler olarak da tanımlanır. Ekstragenik, gen, kromozomal ve genomik mutasyonlar dahil olmak üzere çeşitli mutasyon sınıflarına neden olabilmektedirler (Schrader, 2016). Mutasyonlar DNA dizilerinde oluşan değişimlerdir. Hem germ hem de somatik hücrelerde oluşabilir. Germ hücrelerinde oluşan mutasyonlar bir dizi genetik hastalıkta kendini gösterirken, somatik hücre mutasyonları karsinogenezin başlamasıyla ilişkilidir (Beranek, 1990). Genotoksik ajanlar, birçok hastalığın başlaması ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle genotoksik ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin belirlenmesi önemlidir (Izquierdo-Vega ve diğerleri, 2017). Genetik toksikoloji testleri, gen mutasyonları (mutajenite) ve/veya kromozomal hasar (klastojenite) yoluyla DNA ile etkileşime girebilen ve DNA’nın yapısını değiştirebilen bileşikler tanımlamak için tasarlanmıştır. Tek bir genetik toksikoloji testi, her türden genetik hasarı öngörmez (Blomme ve Will, 2016). Son yıllarda en çok tercih edilen testler arasında kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri bulunmaktadır (López-Romero ve diğerleri, 2018).

Mitomisin-C (MMC) ve metil metansülfonat (MMS) gibi alkilleyici ajanlar, DNA ile reaksiyona girerek mutajenik ve kanserojenik lezyonlar oluşturmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017). Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarlarını artırarak oksidatif hasara neden olmaktadır (Chen ve diğerleri, 2021). Antimutajenler, mutajenlerin etkilerini azaltabilir ve/veya önleyebilir. Mutajenlerin etki şekilleri hakkındaki bilgiler, antimutajenik bileşiklerin çalışma mekanizmasını aydınlatabilmektedir (Ślarczyńska ve diğerleri, 2014). Antimutajenler, mutajenleri DNA’ya saldırmadan önce etkisiz hale getiren desmutajenler ve DNA hasarından sonra çeşitli mekanizmalar ile mutasyonu azaltan biyoantimutajenler olarak sınıflandırılmaktadır (De Flora ve Ferguson, 2005).

Bu çalışmada probiyotik bir bakteri olan *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}) *in vitro* genotoksik ve mitomisin-C (MMC), metil metansülfonat (MMS) ile hidrojen peroksitin (H_2O_2) neden olduğu hasarlara karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma söz konusu eksopolisakkaritin genotoksik ve antigenotoksik potansiyelinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu amaçla kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri kültüre alınmış insan periferel lenfositlerinde; comet testi ise izole edilmiş insan lenfositlerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca taramalı elektron mikroskopunda (*Scanning Electron Microscope*, SEM) EPS_{KC27L} 'nin yapısı, EPS_{KC27L} ve $EPS_{KC27L} + MMC$ uygulamalarının hücrelerde değişikliğe neden olup olmadığı incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota

İnsan kolonu, binlerce farklı mikroorganizma türüyle en çok çeşitlendirilmiş organlardan biridir ve oldukça aktiftir (Yıldız ve Karataş, 2018). Günümüzde mikrobiyom terimi tipik olarak belirli bir mikrohabitatda yaşayan mikroorganizmaların genomlarının bir koleksiyonunu ifade etmekte olup bakteri, mantar veya arke gibi mikroorganizmaların grubuna mikrobiyota denmektedir (Hooper ve diğerleri, 2002; Liu, 2016). Bunların çoğu bakteriyel olup konakta çeşitli yararlı etkiler göstermektedir (Oerlemans ve diğerleri, 2020). Mikrobiyal yoğunluk bağırsak içeriğinin gramı başına; mide ve duodenumda 10^1 - 10^4 hücreden, jejunum ve ileumda 10^4 - 10^8 hücreye ve kolon ve dışkıda 10^{10} - 10^{12} hücreye yükselmektedir (Dethlefsen ve diğerleri, 2006; Gerritsen ve diğerleri, 2011). Mikrobiyom; insan genomundan 100 kat daha fazla gen içermektedir (Vael ve Desager, 2009).

Mikrobiyal kütleinin %99'u gastrointestinal sistem içinde olmakla birlikte etkilerini lokal ve uzun mesafede gösterebilmektedir. Karaciğer gibi birçok organ, bilinen bir mikrobiyom içermemesine rağmen, anatomik bağlantılar ile bağırsak mikroorganizmalarıyla ilişkilidir (Schwabe ve Jobin, 2013). Bağırsak mikrobiyotası, insan vücudundaki metabolik, fizyolojik, immünolojik süreçlerde ve beslenme sürecinde etkilidir. Kolonizasyon direnci ve antimikrobiyal bileşiklerin üretimi gibi mekanizmalarla patojenlere karşı savunmaya katılırlar. Gastrointestinal sistemin duysal ve motorik fonksiyonlarının, bağırsak bariyerinin ve mukozal bağışıklık sisteminin geliştirilmesi, olgunlaşması ve sürdürülmesinde de rol oynamaktadırlar. Bağırsak epitel hücrelerinin çoğalmasının, büyümesinin ve farklılaşmasının kontrolünü sağlamaktadırlar (Vael ve Desager, 2009; Gerritsen ve diğerleri, 2011). Kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA'lar) üretimi, vitaminlerin sentezi (K vitamini ve biyotin, kobalamin, folatlar, nikotinik asit, pantotenik asit, piridoksin, riboflavin ve tiamin gibi suda çözünür B vitaminleri), kalsiyum, magnezyum ve demirin emilimi, sindirilemeyen diyet bileşiklerinin sindirilmesi, bağışıklık fonksiyonunun geliştirilmesi ve sürdürülmesi de dahil olmak üzere konakçı sağlığının korunmasında bir dizi anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Guarner ve Malagelada, 2003; LeBlanc ve diğerleri, 2013; Greiner ve diğerleri, 2014; Lee-Sarwar ve diğerleri, 2020).

Çeşitli hastalıkların patogeneğinde bağırsak mikrobiyotasının rol oynadığı bilinmektedir (Ghosh ve diğerleri, 2020). Disbiyoz olarak da bilinen mikrobiyota bileşiminin bağırsaktaki patojenlerin baskınlığı nedeniyle bozulması, birçoğunun gastrointestinal yol ile ilişkili olduğu çeşitli hastalıklarla bağlantılıdır. Ancak, filogenetik kompozisyonundaki değişikliklerin belirli bir hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu tartışmalıdır (Gerritsen ve diğerleri, 2011; Ambalam ve diğerleri, 2016). Anormal mikrobiyotanın, iltihabi bağırsak hastalığı (IBD), irritabl bağırsak sendromu (IBS), obezite, kardiyovasküler hastalıklar, Tip 2 diyabet, astım ve atopi gibi oldukça yaygın hastalıklarla ilişkisi bulunmaktadır. Benzer şekilde, karsinogenez de disbiyotik mikrobiyota ile ilişkilidir (Schwabe ve Jobin, 2013; Greiner ve diğerleri, 2014; Castro-Bravo ve diğerleri, 2018). Birkaç metabolik ve nörolojik hastalığın gelişimi doğrudan karaciğer fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. Bağırsak bariyeri fonksiyonunun hedefe yönelik gelişimi, karaciğer fonksiyonlarında iyileşmeye yol açarak bu hastalıkların zayıflamasına neden olur (Ghosh ve diğerleri, 2020). Beyin fonksiyonu ve duygusal davranış, bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerden etkilenmektedir (Ryan ve diğerleri, 2014). Bebek mikrobiyotasındaki gelişim bozukluğu, daha sonraki yaşlarda hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, bebeklerde disbiyoz, sonraki yıllarda çocukluk çağı obezitesi ile atopik ve alerjik hastalıkların gelişimi arasında ilişki bulunmaktadır (Vael ve Desager, 2009; Gerritsen ve diğerleri, 2011).

Mikrobiyota erken bebeklik döneminde nispeten basit olmakla birlikte beslenme, doğum şekli, yaşlanma, ilaç ve antibiyotik kullanımı gibi çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Ambalam ve diğerleri, 2016; Salazar ve diğerleri, 2016). Bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığı ve hastalığında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, bu mikroorganizmaların antibiyotikler, prebiyotikler, probiyotikler ve sinbiyotikler tarafından düzenlenmesi sağlığı iyileştirme ve koruma açısından önemlidir (Gerritsen ve diğerleri, 2011). Diyet bileşenleri, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini şekillendirmekte ve mikrobiyal metabolizmada değişiklikler yoluyla bağırsak bariyeri fonksiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenlemektedirler (Ghosh ve diğerleri, 2020). Probiyotiklerin çoğu doğal olarak insan gastrointestinal sisteminde bulunmaktadır (Gerritsen ve diğerleri, 2011). Birçok probiyotik bakteri, EPS salgılayarak mikrobiyota bileşimini değiştirmektedir. EPS'lerin, patojenik bakterileri inhibe etme, bağırsakta probiyotik kolonizasyonu destekleme ve bağırsak mikroflora özelliğinin dengesini koruma gibi fizyolojik özellikleri bulunmaktadır (Zhou ve diğerleri, 2019; Tang ve diğerleri, 2019; Oerlemans ve diğerleri, 2020). EPS üreten bakteriler, bu yol ile düşük pH, safra tuzları ve çeşitli sindirim enzimleri

gibi olumsuz gastrointestinal sistem ortamına toleranslarını artırarak, bağırsak sisteminde hayatta kalma şanslarını artırabilirler (Xu ve diğerleri, 2019).

2.2. Fonksiyonel Gıdalar

Fonksiyonel gıdalar ‘temel beslenmenin ötesinde sağlık yararı sağlayan gıdalar ve gıda bileşenleri’ olarak tanımlanmaktadır (Corbo ve diğerleri, 2014). Fonksiyonel gıda bilimi, prebiyotiklerin kullanımı yoluyla kolon mikrobiyotasını teşvik etmeyi amaçlamaktadır (Yıldız ve Karataş, 2018). Laktik asit bakterileri (LAB) ve laktik asit bakterilerinden türetilen EPS’ler, insan sağlığı açısından faydalı etkileri olan, besin açısından zengin fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesi için önemli ekonomik ve terapötik potansiyele sahiptirler (Bajpai ve diğerleri, 2016). EPS’ler fonksiyonel gıda endüstrisinde immünostimülan (bağışıklık sistemini uyaran) veya immünsüpresif (bağışıklık sistemini baskılayan) ajanlar olarak gıda katkı maddeleri gibi potansiyel kullanıma sahip olabilirler (Ryan ve diğerleri, 2014; Singh ve Saini, 2017). Antioksidanlar, oksidatif stresi azaltma yetenekleri nedeniyle fonksiyonel gıda, terapötik ajan, gıda katkı maddesi ve besinlerin korunmasında koruyucu ajan olarak kullanılırlar (Andrew ve Jayaraman, 2020).

2.3. Ekzopolisakkaritler

Polisakkaritler, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bir tür doğal makromolekül polimerlerdir. Yapı veya kaynaklarına bağlı olarak farklı kimyasal çeşitlilik, fizyolojik özellik ve biyolojik aktivite sergilemektedirler. Antikanser, antivirüs, antioksidasyon ve bağışıklık regülasyonu gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler (Laiño ve diğerleri, 2016; Chen ve Huang, 2018; Zhou ve diğerleri, 2019). Polisakkaritler, çoğu hücrenin yüzeyini kaplayan, bağışıklık yanıtı, yapışma, enfeksiyon ve sinyal iletimi gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda önemli rol oynayan, doğal, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerdir (Adebayo-Tayo ve Popoola, 2017). Gıdalarda viskozite arttırıcı, dengeleyici, emülgatör, jelleştirici, koyulaştırıcı, stabilizatör ve su bağlayıcı maddeler olarak işlev görebilirler (Patel ve Prajapat, 2013; Zhou ve diğerleri, 2019).

Mikrobiyal polisakkaritler, yüksek moleküler ağırlıklı karbonhidrat polimerleridir ve kapsüler polisakkaritler (CPS), lipopolisakkaritler (LPS) ve ekzopolisakkaritler (EPS) olarak gruplandırılabilirler. Bu polisakkaritler mikrobiyal bütünlüğü korurlar ve hayatta kalmayı

sağlayan farklı görevleri yerine getirirler. CPS'ler çoğunlukla bakterilerin patojenisitesiyle ve virülans teşvik edici faktörlerle ilişkilidir. LPS'ler ise genellikle hücre duvarı bileşeni olup Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunur. Ayrıca patojenik organizmalarda önemli bir virülans faktörü olarak işlev görürler (Patel ve diğerleri, 2010; Yıldız ve Karataş, 2018; Zhou ve diğerleri, 2019).

Ekzopolisakkaritler (EPS), kompozisyonlarına ve fizikokimyasal özelliklerine göre değişen, çeşitli uzun zincirli ve yüksek moleküler kütleli polisakkarit grubudur (Lynch ve diğerleri, 2018). EPS'ler, şeker ve şeker türevlerinin monosakkarit rezidülerinden oluşan, bitkiler, algler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen, suda çözünebilen polimerlerdir. Bakteriye hücre yüzeyine zayıf veya kuvvetli bir şekilde bağlanabilir veya çevreye salgılanmış formda bulunabilirler (Ruas-Madiedo ve diğerleri, 2002; Dilna ve diğerleri, 2015; Caggianiello ve diğerleri, 2016).

Ticari olarak temin edilebilen EPS'lerin büyük bir kısmı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Yıldız ve Karataş, 2018). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* gibi LAB türlerinden sıklıkla EPS üretilmektedir (Behare ve Kumar, 2019). EPS'ler mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretildiklerinden, çeşitli uygulamalar için yüksek miktarda ve saflıkta kolayca temin edilebilirler. Ayrıca bitkilerden ekstrakte edilen polisakaritlere kıyasla çok daha yüksek verimle elde edilebilirler (Badel ve diğerleri, 2011; Moscovici, 2015). Sentezlenen EPS miktarı ve karakteri; pH, sıcaklık ve inkübasyon süresinden etkilenmekte olup substrat miktarına ve bileşimine göre de değişiklik gösterebilir (Altun, 2018). EPS'lerin hücre etrafındaki kalınlığı genellikle 0,2-1 µm'dir (Shukla ve diğerleri, 2019). Mikrobiyal EPS'ler, üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynakları olarak kullanılmazlar (Ruas-Madiedo ve diğerleri, 2002). Ancak karbon ve enerji rezervleri olarak işlev görürler (Yıldız ve Karataş, 2018).

Mikrobiyal EPS'nin doğal ortamlarındaki mikrobiyal hücrenin; sıcaklık, ışık yoğunluğu, değişken pH, kuruma, osmotik stres, antibiyotikler veya toksik bileşikler (örneğin, toksik metal iyonları, kükürt dioksit ve etanol), protozoanlar tarafından avlanma, fagositoz ve faj saldırısı olmak üzere biyotik ve/veya abiyotik stresler gibi olumsuz durumlara karşı korunmasında bir rol oynadığı düşünülmektedir (Ruas-Madiedo ve diğerleri, 2002; Patel ve Prajapat, 2013; Caggianiello ve diğerleri, 2016). Ayrıca mikroorganizmalarda kayma

hareketi, detoksifikasyon ve metallerin şelasyonu gibi fonksiyonlar da EPS'yle ilişkilidir. (Adebayo-Tayo ve Popoola, 2017).

QPS (Nitelikli Güvenilirlik Varsayımı - *Qualified Presumption of Safety*) ve GRAS (Genel Olarak Güvenli Tanınan - *Generally Recognized as Safe*) statüsünde olan *Lactobacillus* cinsi LAB'lerden ve *Bifidobacterium* cinslerinden üretilen EPS'ler de GRAS olarak tanımlanmaktadır. Mikrobiyal EPS'ler bitki ve hayvan kaynaklı EPS'ye alternatif olarak kullanılabilirler (Dilna ve diğerleri, 2015; Ryan ve diğerleri, 2015; Escárcega-González ve diğerleri, 2018). Örneğin bakteriyel selüloz, yüksek gerilme mukavemeti ve daha iyi su tutma kapasitesi ile bitki selülozunun yerini alabilir (Shukla ve diğerleri, 2019).

2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları

EPS'ler, gıda (biyolojik olarak parçalanabilir gıda ambalajı, kıvam arttırıcı, emülgatör, jelleştirici ajan), sağlık (aşılar için adjuvan, biyofilm matrisi, kontrollü ilaç salımı için nanoparçacık), tarım (kök suyunun tutulması, tuz toleransını artırma), kozmetik (reolojik stabilizatör, koku taşıyıcı) ve nanopartikül alanları da dahil birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Altun, 2018; Santos ve Amorim, 2018). EPS'lerin endüstriyel ve mühendislik uygulamalarının çoğu dokusal ve yapışma özellikleriyle ilişkilidir (Zhou ve diğerleri, 2019). Bu kullanım alanlarından en önemlilerini açıklayacak olursak;

Gıda alanı

EPS peynir, tereyağı ve yoğurt gibi süt ve süt türevli ürünlerin dokusunu, reolojisini ve arttırılmış ağız hissini geliştirmenin yanı sıra, yoğurta emülsiyonlaştırma, kalınlaştırma, jelleştirme, sinerez azaltma, su bağlama ve viskozite gibi fonksiyonel özelliklere katkıda bulunmak için fermente süt ürünlerinde kullanılmaktadır (Dilna ve diğerleri, 2015; Ryan ve diğerleri, 2015; Singh ve Saini, 2017; Saadat ve diğerleri, 2019). Mozzarella peyniri üretimi için kullanılan EPS; nem tutma ve doku özelliklerinde artışa neden olmuş ve peynire sertlik kazandırmıştır (Bhaskaracharya ve Shah, 2000).

EPS kullanılarak üretilen dondurmanın daha uzun sürede çözöldüğü ve daha düşük hacimde olduğu tespit edilmiştir. Uygun EPS'nin tek başına veya ticari olarak dengeleyicilerle birlikte dondurma üretiminde kullanılması mümkündür, ancak seçilen EPS'nin özgülüğü veya

fizikokimyasal özellikleri derinlemesine araştırılmalıdır (Altun, 2018). Tahıl alanlarında, unlu mamullerin iyileştirilmesi için uygulanmaktadır. EPS'nin hamur ve ekmekte kullanılması, hamurun su emilimini ve kırıntı yumuşaklığını artırır, mikrobiyal bozulmayı geciktirir ve daha iyi hamur reolojisi sağlar. Ayrıca ekmeğin yapısını koruyarak raf ömrünün artmasına neden olur (Lynch ve diğerleri, 2018). LAB tarafından üretilen EPS, gıdalarda yerinde üretimin yanı sıra doğal katkı maddeleri olarak da kullanılabilir (Adebayo-Tayo ve Popoola, 2017).

Sağlık alanı

EPS ve türevleri; kolay ulaşılabilen, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen, biyouyumlu, potansiyel olarak toksik olmayan, biyolojik olarak çözünebilir ilaç taşıyıcıları gibi tıbbi alanlarda oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuştur. EPS'ler cilt ve kemik onarımı, kontrollü salınım sistemleri, yapay organların implantasyonu, protezler, antikanser ilaç hedeflemesi, aşı üretimi, gen teslimi, teşhis, yara iyileştirme, diş hekimliği, ortopedik cerrahi, doku mühendisliği ve tıbbi cihazların kaplanması gibi çok çeşitli biyomedikal alanlarda da kullanılabilir. Teşhislerde kullanılan polisakarit kaplı nanoparçacıklar, tıbbi görüntüleme ve teranostiklerde (teşhis ve tedavi) kilit rol oynayabilir (Moscovici, 2015; Shih, 2010; Barcelos ve diğerleri, 2019; Saadat ve diğerleri, 2019). EPS, cildin ana kısmı olan dermal fibroblastlarının 4°C'de canlılığını artırır. Bu nedenle, insan cildini soğuk yaralanmalardan korumak için kriyoprotektif olarak kullanılabilir (Sun ve diğerleri, 2015).

EPS adjuvan sistemi olarak, özellikle influenza pandemik suşları gibi zorlu patojenleri (H₁N₁, sıtma gibi parazitler, AIDS gibi virüsler veya tüberküloz gibi dirençli mikobakteriler gibi) hedef alan güçlü bir bağışıklık tepkisi sağlayarak aşı kaynaklı korumayı artırabilir (Saadat ve diğerleri, 2019).

Tekstil endüstrisi

EPS'nin viskozite, stabilizatör özellikleri ve kumaşlarla çapraz bağlanma yetenekleri boyalarda ve hidrojellerde etkili bağlayıcı ajan olarak kullanılmasını sağlar. Akıllı kumaşlar da EPS'nin yeni uygulamalarından biridir. Yüksek gözeneklilik sayesinde yanık tedavilerinde, yara örtüsü malzemesi ve özel kıyafetlerin hazırlanmasında, hidrofilik

özellikleri nedeniyle de spor kıyafetlerinin hazırlanmasında kullanılırlar (Shukla ve diğerleri, 2019).

Tarım

EPS üreten bakteriler toprağın verimliliğini arttırmada önemli bir rol oynamaktadır. EPS bitkide nodül oluşumunu, kök suyu tutma oranını ve tuz toleransını arttırmada etkilidir. Tohumları canlandırmayı sağlamakla birlikte kurumaya ve toksik metallerle karşı korumaktadır. Ayrıca, patojenleri ortadan kaldırarak ve besin maddelerinin alımını artırarak bitki kök ve sürgün büyümesini sağlamaktadırlar (Santos ve Amorim, 2018; Shukla ve diğerleri, 2019). EPS kirlenmiş toprağın endüstriyel atık sulardan, madencilik endüstrisinden ve tarımsal verimlilik için kullanılan kimyasallardan temizlenmesi ve biyolojik olarak iyileştirilmesi için de kullanılmaktadır (Sardar ve diğerleri, 2018).

Biyoremediasyon

Biyoremediasyon, kontamine bölgede bulunan tehlikeli madde miktarını azaltmak veya yok etmek için mikroorganizmaların ve bitkilerin kullanıldığı potansiyel bir iyileştirme tekniğidir. Özellikle hidrokarbonlarla kontamine olmuş bölgelerde potansiyel bir toprak ıslah teknolojisi olarak uygulanmaktadır. Biyoremediasyon işlemlerinde iyon bağlama özelliklerine sahip oldukları için bakteriyel polisakkaritler tercih edilmektedir. EPS'nin metal bağlama bölgesi için seçicilik özelliği, kanalizasyon arıtımında zehirli ve ağır metal kirleticilerinin giderilmesi için potansiyel olarak büyük önem taşımasını sağlamaktadır (Shukla ve diğerleri, 2019).

Petrol endüstrisi

Petrol endüstrisinde, mikroorganizmalar ve EPS'ler, 'Mikrobiyal Geliştirilmiş Yağ Geri Kazanımı (MEOR)' olarak bilinen yağın geri kazanımı ve petrolün çıkarılması için kullanılırlar. MEOR, genellikle birincil ve ikincil geleneksel yöntemleri kullanarak yağ geri kazanımının artık mümkün olmadığı üçüncül bir aşama olarak kullanılan bir tür gelişmiş yağ geri kazanım teknolojisidir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha iyi uygulanabilir. Bunun yanı sıra çevre dostu, düşük maliyetli ve düşük çevresel toksisiteye sahiptir (Geetha ve diğerleri, 2018; Shukla ve diğerleri, 2019; Zhang ve diğerleri, 2020).

Kozmetik endüstrisi

Bakteriyel polisakkaritler, cilt bileşenlerinin biyosentezini uyarma kapasiteleri, cilt hidrasyonu üzerindeki olumlu etkileri ve hücre yenilenmesini sağlamaları ile cilt bakımında adjuvan olarak kullanılmaktadırlar (Majee ve diğerleri, 2017).

Nanopartikül

Nanopartiküller (NP) tıp, cerrahi, kozmetik, biyofizik, kimya, uzay, elektronik, tarım ve spor gibi insan yaşamını etkileyen birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser ilaçlar, ilaç salım sistemleri, kimyasal sensörler, kontrast maddeler ve katalizörler gibi biyomedikal alanlardaki uygulamalarıyla metal nanopartiküllerin sentezi ve stabilizasyonu son zamanlarda ilgi çeken bir konudur. NP sentezi için kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler pahalıdır ve toksik yan ürünlerin üretimini içerdiğinden çevresel olarak güvenli değildir. Bu nedenle daha güvenilir ve çevre dostu nanopartiküller üretmek için biyolojik yöntemler gibi alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkiler ve hayvanların yanı sıra bakteriler, mantarlar, mayalar ve alglerden saflaştırılmış polisakkaritler, NP'lerin sentezi için indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak kullanılmaktadır. En çok araştırılan ve üretilen nanopartiküller arasında gümüş (Ag-NP) ve altın (Au-NP) nanopartikülleri yer almaktadır (Adebayo-Tayo ve Popoola, 2017; Saravanan ve diğerleri, 2017; Escárcega-González ve diğerleri, 2018).

Yapılan bir çalışmada, LAB'dan üretilen EPS'ler ile stabilize edilmiş AgNP'lerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlenmiş, dolayısıyla bunların geniş spektrumlu antimikrobiyal olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (Adebayo-Tayo ve Popoola, 2017). Ksantan zinkinin Au-NP'lerin sentezinde kullanıldığı bir çalışmada ise, bu moleküllerin insan akciğer kanseri hücrelerinde doksorubisin hidroklorür (DOX) için etkili bir ilaç taşıyıcı olduğu kanıtlanmıştır. NP'lerin biyolojik olarak uyumlu olduğu, toksik etkilerinin olmadığı ve 24 saate kadar dayanıklılık gösterdiği gözlemlenmiştir (Pooja ve diğerleri, 2014). Bakteriyel EPS'ler kullanılarak sentezlenen metalik NP'lerin uygulama alanlarından bazı örnekler Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteriyel EPS'ler kullanılarak sentezlenen metalik NP'lerin uygulama alanları (Escárcega-González ve diğerleri, 2018).

EPS	NP	Uygulama Alanları
Ksantan Zamkısı (Xanthan Gum)	Au-NP	İlaç taşıma, antikanser tedavisi
	Ag-NP	Antibakteriyel
	Pd/Fe-NP	Toprak iyileştirme
Dekstran (Dextran)	Ag-NP	Antibakteriyel ve antifungal
	Au-NP	Antikanser
Kurdlan (Curdlan)	Au-NP ve Zn-NP	Protein etkileşimi
	Se-NP	Antioksidan, sitotoksikite deneyleri
Jellan Zamkısı (Gellan Gum)	Au-NP ve Fe ₃ O ₄ -NP	İlaç taşıma, antikanser tedavisi
	Ag-NP	Antibakteriyel
Selüloz (Cellulose)	Ag-NP	Nanofiber, kimyasal sensör
	Au-NP	Enzim immobilizasyonu
	Cu-NP	Antibakteriyel, nanofiber

EPS modifikasyonu

Çeşitli kimyasal modifikasyon yöntemleri ile polisakkaritler ve EPS'ler istenilen fonksiyonel özellikleri kazanabilir ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilirler. Modifikasyonlar, EPS'lerin yan zincirlerinin doğasını değiştirme veya çapraz bağlanma reaksiyonu yollarıyla onların diğer biyomakromoleküllerle kimyasal reaksiyonları indükleyebilmektedir. Modifikasyonlardan bazıları enzimatik ve enzimatik olmayan yöntemlerle fosforilasyon, selenilasyon, karboksimetilasyon, sülfasyon, asetilasyon ve asit/alkali bozunumudur. Gen ekspresyon çalışmaları ve moleküler teknikler, mikrobiyal EPS'lerin daha fazla üretilmelerini, daha fonksiyonel ve çok yönlü özellikler kazanmalarını sağlayabilir, EPS'lere modifikasyon sürecinde özgüllük kazandırabilir (Bajpai ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2016; Majee ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2019).

Mikroorganizmalar tarafından en çok üretilen ve literatürde geniş yer kapayan EPS'lerden bazıları dekstran (dextran), ksantan (xanthan), selüloz (cellulose), kurdlan (curdlan), hyalüronik asit (hyaluronic acid), süksinoglukan (succinoglycan), jellan (gellan), aljinat (alginate) ve levandır (Escárcega-González ve diğerleri, 2018). Bunların monomer birimleri,

izole edildikleri mikroorganizmalar, özellikleri ve uygulama alanları Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Ticari olarak önemli EPS’lerin özellikleri ve uygulama alanları (Patel ve Prajapat, 2013; Sanlibaba ve Çakmak, 2016; Hussain ve diğerleri, 2017; Santos ve Amorim, 2018; Saadat ve diğerleri, 2019; Shukla ve diğerleri, 2019)

EPS	Monomer birimleri	Mikroorganizma	Özellikleri	Uygulama Alanları
Dekstran (Dextran)	Glikoz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>	Non-iyonik karakter, Stabilite	Veterinerlik ve insan tıbbında antikoagülan, kan plazması genişletici, kan akışını iyileştirici, kolesterol düşürücü, adjuvan ajan, Doku ve hücre kültüründe mikro taşıyıcı, Gıdalarda emülgatör, Şekerleme ürünlerinde şekerin kristalleşmesini engelleme Kağıt endüstrisi Yağ geri kazanımı
Ksantan (Xanthan)	Glikoz, Mannoz, Glukuronik asit, Asetat, Piruvat	<i>Xanthomonas campestris</i>	Geniş sıcaklık aralığında yüksek viskozitede kararlılık	Antiviral ve antikanser ajan Gıda endüstrisinde emülgatör stabilizatör ve kıvam arttırıcı İkincil ve üçüncül ham petrol geri kazanımı, Kozmetik ve kişisel bakım ürünleri, saç renklendirici Boya ve eczacılık endüstrisi
Levan	Fruktoz	<i>Alcaligenes viscosus</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i>	Polimerik tıbbi özellikler Yağda ve suda yüksek çözünürlük, Yapışkanlık, Biyouyumluluk Film oluşturma	Gıda endüstrisinde biyolojik kıvamlaştırıcı, tatlı şekerleme üretimi, Prebiyotik, antitümör ve hipokolesterolemik ajan, çevre dostu yapıştırıcı, İlaç ve kozmetik endüstrisi Hayvan yemi Peptit bazlı ilaç nano taşıyıcı
Jellan (Gellan)	Glikoz, Ramnoz, Glukuronik asit, Asetat, Gliserat	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Sphingomonas elodea</i>	Yüksek akma gerilimi, Düşük viskozite, Suda çözünme, Anyonik yapı	Yenilebilir film, jelatin, tatlı ve reçel yapımı, Kültür ortamının katılaşması için jelleştirici madde, İlaç endüstrisi Gıda sanayinde stabilizatör, kıvamlaştırıcı ve jelleştirici ve süspanse edici ajan
Kurdan (Curdan)	Glikoz	<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i>	Jel oluşturma kabiliyeti, Suda çözünmeme	Jelleştirici ajan, AIDS karşıtı ilaç, Gıdalar ve ilaç endüstrisinde ağır metal giderimi

Çizelge 2.2. (devam) Ticari olarak önemli EPS'lerin özellikleri ve uygulama alanları (Patel ve Prajapat, 2013; Sanlibaba ve Çakmak, 2016; Hussain ve diğerleri, 2017; Santos ve Amorim, 2018; Saadat ve diğerleri, 2019; Shukla ve diğerleri, 2019)

EPS	Monomer birimleri	Mikroorganizma	Özellikleri	Uygulama Alanları
Selüloz (Cellulose)	Glikoz	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Yüksek çekme dayanımı	Yanıkları veya cerrahi yaraları iyileştirmek için geçici yapay cilt, Gıdalarda sindirilemez lif Baypas operasyonlarında yapay kan damarı
Hyalüronik Asit (Hyaluronic acid)	Glukuronik asit, Glukozamin	<i>Streptococcus equii</i> , <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Hücre adezyonu, hücre motilitesi, pseudo plastik, viskoelastik	Yapay gözyaşı sıvısı ve oftalmik cerrahi, Yara iyileşmesi, Sinoviyal sıvı yenileme, Kozmetik endüstrisinde losyon, nemlendirici ajan
Emülsan	Şeker, Yağ asidi	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Sabit su içinde yağ emülsiyonları oluşturabilme	Canlı hücreler ve enzimler için immobilizasyon matrisi, Hipoalerjik yara iyileştirici, İlaç dağıtımı, Ham petrol geri kazanımı, Fidan ve bitki köklerinin kurumaya karşı kaplanması, Pestisit
Aljinat (Alginate)	Guluronik asit, Mannuronik asit, Asetat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	Film oluşumu, Jelleşme kapasitesi	Canlı hücreler ve enzimler için immobilizasyon matrisi, Hipoalerjik yara iyileştirici, Kontrollü ilaç salımı, Fidan ve bitki köklerinin kurumaya karşı kaplanması, Bitki doku kültüründe yapay tohum üretme Pestisit Gıda hidrokolloidi, Pansuman malzemelerinin hazırlanması Gıda endüstrisinde kıvam artırıcı
Süksinoglukan (Succinoglycan)	Glikoz, Galaktoz	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i>	Yüksek viskozite, Asit stabilitesi	Yağ geri kazanımı, Jelleştirici ajan, İmmobilizasyon matrisi, AIDS karşıtı ilaç
Velan (Welan)	Mannoz, Ramnoz, Glikoz, Glukuronik asit	<i>Alcali genes</i> sp.	Yüksek sıcaklıklarda kararlı ve viskoz	Çimento sistemlerinde ve petrol sondaj sahalarında stabilizatör, Tekstil endüstrisi Yağ geri kazanımı
Alterman	Glikoz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Yüksek çözünürlük, Düşük viskozite Enzimatik hidrolize karşı direnç	Kozmetik Prebiyotik Hacim artırıcı Şekerlemelerde düşük glisemik indeksli tatlandırıcı

2.3.2. Ekzopolisakkaritlerin sağlık ile ilişkisi

LAB tarafından üretilen EPS'ler prebiyotik potansiyellerinin yanı sıra antikanser, antioksidan, antiproliferasyon, kan kolesterol ve glikoz düşürücü, immünomodülatör, antikoagulan, antibiyofilm, antiviral, antiülser ve antihipertansif aktiviteler dahil olmak üzere insan veya hayvan sağlığında çeşitli potansiyel fonksiyonlara sahiptir (Badel ve diğlerleri, 2011; Saadat ve diğlerleri, 2019; Ale ve diğlerleri, 2020). Laktoz intoleransının hafifletilmesi, β -glukuronidaz ve nitroredüktaz gibi mutajenik enzimlerin azaltılması gibi etkileri de bulunmaktadır (Bajpai ve diğlerleri, 2016).

EPS'lerin prebiyotik etkileri

Prebiyotikler, 'sağlık yararı sağlayan konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan substratlar' olarak tanımlanmaktadır (Gibson ve diğlerleri, 2017). Literatürde EPS'nin de insan gastrointestinal sisteminden geçerken diğler prebiyotikler (fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler ve inülin gibi sindirilemeyen polisakkaritler) gibi gastrointestinal sistem bütünlüğünü koruması hakkında çeşitli çalışmalar vardır (Ryan ve diğlerleri, 2015). EPS'nin koruyucu tabakası, konağın gastrointestinal sisteminde bağırsak geçişi sırasında EPS üreten laktik asit bakterilerini (LAB) ve diğler probiyotik mikroorganizmaların hayatta kalma süresini uzatır ve seçici olarak artırılması yoluyla prebiyotik etki gösterir (Patel ve diğlerleri, 2010; Hongpattarakere ve diğlerleri, 2012; Zhou ve diğlerleri, 2019). İnsanlarda değerlendirilen ve ticari olarak kullanılan prebiyotiklerin çoğunun *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'u spesifik olarak uyardığı, ancak Clostridia sınıfı ve *Escherichia coli*'nin bazı üyeleri gibi patojenleri uyarmadığı gösterilmiştir (Gibson ve diğlerleri, 2017).

EPS'lerin antioksidan özellikleri

Sentetik antioksidanların gıda ürünlerinde kullanımı, sayısız faydasının yanında insan sağlığı üzerinde birçok olumsuz etkiye de neden olabilmektedir (Andrew ve Jayaraman, 2020). LAB'dan elde edilen EPS'lerin, serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol oynayarak doğal antioksidanlar olarak işlev gördüğü ve sağlık açısından güvenli olduğu bilinmektedir. Toksik etkileri bulunan sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilirler (Saadat ve diğlerleri, 2019). Diğler kaynaklardan elde edilen polisakkaritlerin mekanizmasına benzer şekilde,

mikrobiyal kaynaklardan EPS'nin de hidrojen verme yeteneği, bazı antioksidan fonksiyonlar için baskın özellik olarak kabul edilmektedir (Andrew ve Jayaraman, 2020).

Birçok çalışmada *Lactobacillus* cinsi bakterilerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) ile hidroksil radikallerini ($OH^{\cdot-}$) temizleme ve demir iyonu (Fe^{2+}) şelatlama aktiviteleri sergilediği raporlanmıştır (Li ve diğerleri, 2014; Wang ve diğerleri, 2014; Tang ve diğerleri, 2017). Bu nedenle polisakkaritler serbest radikal temizleyici, indirgeyici madde ve metal şelatlayıcı antioksidanlar olarak kabul edilmektedirler (Wang ve diğerleri, 2016; Rajoka ve diğerleri, 2020).

EPS'lerin antikanser etkileri

LAB gibi güvenli doğal kaynaklardan elde edilen EPS'ler genellikle düşük sitotoksositeye ve yan etkilere sahiplerdir. Ayrıca sentetik antikanser ajanlarının yerine alternatif olarak kullanılabilirler (Saadat ve diğerleri, 2019; Abdelnasser ve diğerleri, 2020). Kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemlerle karşılaştırıldığında, normal hücrelere zararlı bir etkisi yoktur (Zhou ve diğerleri, 2018). EPS'ler, reaktif oksijen türlerini (ROT) mitokondrilerden uzaklaştırabilir, kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir, T ve B lenfositleri ve makrofajlar tarafından interlökin salınımının indüksiyonunu uyarabilir ve kanser hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe edebilirler (Ismail ve Nampoothiri, 2013; Berthold-Pluta ve diğerleri, 2019).

EPS'lerin immünomodölatör etkileri

EPS moleküllerinin bağışıklık sistemini modüle edebildikleri bildirilmiştir (Saadat ve diğerleri, 2019). Bu moleküller enfeksiyonları baskılayabilir, gastrointestinal sistem kanserlerini ve enflamatuar bağırsak hastalıkları gibi immün yetmezlik kaynaklı hastalıkları önleyebilir (Singh ve Saini, 2017; Saadat ve diğerleri, 2019). Bağışıklık sistemi patojenler ve komensal bakteriler tarafından üretilen EPS'yi ayırt edebilmektedir (Round ve diğerleri, 2011; Laiño ve diğerleri, 2016). Çoğu EPS bağışıklık ile ilgili genleri modüle ederek, makrofajları aktive ederek, lenfosit proliferasyonunu uyararak ve sitokinleri serbest bırakarak enflamasyon düzenleyici aktivite göstermektedir (Zhou ve diğerleri, 2019).

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* suşlarından elde edilen EPS'lerin bağışıklık uyarıcı veya bağışıklık modüle edici etkileri raporlanmıştır (Patten ve diğerleri, 2014; Castro-Bravo ve diğerleri, 2018; You ve diğerleri, 2020).

EPS'lerin antiviral etkileri

EPS'lerin virüslerin konakçı hücreye adsorbsiyonunu ve penetrasyonunu engelleme, çeşitli retroviral ters transkriptazı inhibe etme yolları ile viral enfeksiyonu önleyebildiği bilinmektedir (Saadat ve diğerleri, 2019).

Laktik asit bakterileri ve bunlardan üretilen polisakkaritlerin, ciddi yan etkilere sahip çeşitli sentetik antibiyotik ve antiviral maddelere göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bu polisakkaritlerin geniş bir antiviral etkinlik aralığı, düşük toksisite, düşük viral ilaç direnci ve yüksek liyofilik özellikleri onları yakın gelecekte güvenli ve yaygın olarak kullanılabilecek antiviral ilaç keşifleri için güçlü aday yapmaktadır (Bajpai ve diğerleri, 2016).

EPS'lerin kan kolesterol düşürücü etkileri

LAB tarafından sentezlenen EPS'lerin, kolesterol moleküllerini adsorbe etme kabiliyetleriyle kolesterol seviyelerini düzenleyebildikleri düşünülmektedir (Saadat ve diğerleri, 2019). EPS'ler diyet liflerine benzer şekilde davranırlar, kolesterol düşürme mekanizmasının tam olarak bilinmemekle birlikte, olası mekanizmanın safra asitlerinin atımının artması ve kolesterol emiliminin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bağırsaktaki bakteriler tarafından kolesterolün asimilasyonunun, emilim için mevcut kolesterol miktarını azalttığı ve böylece serum kolesterol seviyesini düşürdüğü de önerilmektedir (Nampoothiri ve diğerleri, 2017).

2.3.3. Ekzopolisakkaritlerin olumsuz özellikleri

Probiyotiklerden elde edilen EPS'lerin olumlu yönlerinin yanı sıra olumsuz yönleri de bulunmaktadır. Şarap hazırlama sırasında LAB tarafından EPS üretimi, zararlı reolojik özelliklere sahip ürünlerle sonuçlanabilmektedir. Patojen mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS'ler ayrıca, biyolojik kirlenmeye yol açan biyofilm oluşumundan sorumludur. Bir biyofilm, salgılanan bir matris yüzeyine gömülü mikroorganizmaların toplamıdır. Bu

yapışkan matrisler; hücre dışı polimerik maddelerden, DNA'dan, proteinden ve polisakkaritten oluşmaktadır. Süt endüstrisindeki biyolojik kirlenmenin sebebi süt ürünlerinin işlenmesi için kullanılan ekipmanlarda oluşan biyofilmlerdir. Bu birçok teknik ve hijyen sorununa neden olmaktadır (Badel ve diğerleri, 2008; Patel ve diğerleri, 2010, Zhou ve diğerleri, 2019). LAB tarafından üretilen EPS'ler et ürünlerinde genel olarak bozulma faktörleri olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, dış plağı oluşumu da bu moleküllerin sentezinden kaynaklanmaktadır (Xu ve diğerleri, 2019). Ancak EPS'lerin olumlu özelliklerinin yanında olumsuz özellikleri oldukça azdır.

2.4. *L. salivarius* ve EPS_{KC27L}

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) probiyotikleri “yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalar” şeklinde tanımlamaktadır (Hill ve diğerleri, 2014; Salazar ve diğerleri, 2016). Probiyotiklerin kan kolesterol seviyesini düşürme, osteoporozu önleme, antihipertansi, bağırsak patojenlerine karşı antimikrobiyal etki, immünomodülatör etki, laktoz intoleransı gibi bazı intoleransları hafifletme, kolon kanserini önleme, duyarlı bireylerde alerjilerin prevalansını azaltma ve antimutajenik aktiviteleri bulunmaktadır. Ayrıca konağın enerji metabolizmalarını düzenledikleri ve bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek gastrointestinal hastalık risklerini azaltabildikleri raporlanmıştır (Ambalam ve diğerleri, 2016; Abid ve diğerleri, 2018). Probiyotiklerin sağlığı geliştirici etkileri kısmen ekzopolisakkaritlere atfedilmiştir (Nwodo ve diğerleri, 2012).

Probiyotik bakteriler, prebiyotik gibi karbonhidratların fermentasyonu ile asetat, propiyonat, bütirat, süksinat ve laktat gibi kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretmektedir. Bu asitlerin hem lokal hemde sistemik fonksiyonları bulunmaktadır. Mukozal hücre farklılaşması, epitel bariyer fonksiyonunun desteklenmesi, apoptozun indüklenmesi, hücre farklılaşması, oksidatif stres ile ilişkili elektrofillerin detoksifiye edilmesi ve kanserin önlenmesi gibi etkileri vardır (Roy ve diğerleri, 2006; Ambalam ve diğerleri, 2016; Gibson ve diğerleri, 2017).

En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar esas olarak bakteriyel *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir (Gerritsen ve diğerleri, 2011; Shokryazdan ve diğerleri, 2017). LAB olarak tanımlanan bu bakteriler GRAS olarak bildirilmiştir. Bu nedenle gıda

sınıfı bakteriler olarak kabul edilmekte ve gıdalarda probiyotik olarak kullanılması hukuki açıdan da bir sorun teşkil etmemektedir (Abid ve diğerleri, 2018). *Lactobasillus*lar, topraktan, bitkilerden insanların ve hayvanların gastrointestinal yollarına kadar geniş bir yelpazede yaşayan Gram-pozitif, çubuk veya kok şeklinde, spor oluşturmeyan bakterilerdir (Li ve diğerleri, 2007; Harris ve diğerleri, 2017).

L. salivarius insan, domuz, hamster ve kuş gastrointestinal sistemlerinde yerli mikrobiyotanın bir parçasıdır. İnsanlarda anne sütünden, domuz ve tavukların bağırsak yollarından yaygın olarak izole edilebilir (Raftis ve diğerleri, 2011; Messaoudi ve diğerleri, 2013). Bu tür adını ilk kez izole edildiği ağız boşluğunun ‘tükürük (saliva)’ özelliğinden almaktadır (Neville ve O’Toole, 2010). Bağırsak *Lactobacillus* popülasyonunda sayısal olarak üstünlük sağlayan birkaç türden biridir (Tannock ve diğerleri, 2000). Bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, antimikrobiyal madde üretme, patojenin yapışmasını azaltma, bağışıklığı uyarma ve kısa zincirli yağ asidi üreterek bağırsağın asitlenmesini sağlama gibi probiyotik özellikler birçok *L. salivarius* türüne atfedilmiştir. *L. salivarius*’un patojenleri ve konakçının antimikrobiyal savunmasını tolere edebilme yeteneği, gastrointestinal sisteme adaptasyonunun göstergesidir (Messaoudi ve diğerleri, 2013; Lee ve diğerleri, 2017). *L. salivarius* suşlarının insanlar ve hayvanlar için probiyotik ajan olarak kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır (Raftis ve diğerleri, 2011). Çeşitli çalışmalar *L. salivarius* suşlarının astımlı kişilerde immünomodülatör (Drago ve diğerleri, 2015), kötü ağız kokusunu önleme (Iwamoto ve diğerleri, 2010), oral patojenlerin virölansını azaltma (Nissen ve diğerleri, 2014) ve prematüre bebeklerin gastrointestinal sistem sağlığı üzerinde koruyucu (Moles ve diğerleri, 2015) etkilerinin olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca akut karaciğer yetmezliğini önlemede (Lv ve diğerleri, 2014), atopik dermatitin tedavisinde (Wu ve diğerleri, 2012) ve çeşitli kanserleri engellemede (Zhu ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2015) de kullanılabilir. Dolayısıyla *L. salivarius*’un çeşitli suşları bu ve bunlarla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel probiyotikler olarak tercih edilebilir. Birincil araştırma kanıtlarından elde edilen sonuçlar, *L. salivarius*’un çeşitli uygulamalarda kullanılan dozlarının insanlar veya hayvanlar için sağlık riski oluşturmadığı yönündedir (Chaves ve diğerleri, 2017).

Bu EPS’nin antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteleri daha önce Çelik (2018) tarafından araştırılmıştır. Araştırmacı elde ettiği verileri karşılaştırmak için ticari bir prebiyotik olan inülini kullanmıştır. Bu çalışmaya göre;

EPS_{KC27L}'nin karakterizasyonu

HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) analizi sonucunda EPS_{KC27L}'nin şeker kompozisyonu %52,99 glikoz, %18,51 sükroz, %14,67 arabinoz ve %13,81 mannoz olarak belirlenmiştir. Büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) ile EPS_{KC27L} iki fraksiyondan oluştuğu, bu fraksiyonların moleküler ağırlıklarının $1,6 \times 10^3$ ile $6,4 \times 10^4$ Da arasında değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) ile molekül yapısı aydınlatılmıştır (Çelik, 2018).

EPS_{KC27L}'nin antimikrobiyal aktivitesi

EPS_{KC27L}'nin ve kontrol olarak tercih edilen ticari bir prebiyotik olan inülinin *Staphylococcus aureus* EB1, *Escherichia coli* ATCC 11229 ve *Enterococcus faecalis* 29212 patojen bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite sergilemediği gözlenmiştir. Nedeninin EPS'lerin polisakkarit yapıda olmasından ve patojenler tarafından karbon kaynağı olarak tercih edilebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Çelik, 2018).

EPS_{KC27L}'nin antibiyofilm etkisi

EPS_{KC27L}'nin ve kontrol olarak tercih edilen ticari prebiyotik olan inülinin *Staphylococcus aureus* EB1, *Escherichia coli* ATCC 11229 ve *Enterococcus faecalis* 29212 bakterilerinin biyofilmlerine karşı antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. *S. aureus* EB1 suşunun biyofilmine karşı 0,5 mg/mL EPS_{KC27L}'nin %67; 0,5 mg/mL inülinin ise %53 biyofilm inhibisyonu vardır. Aynı suşun biyofilmine karşı 1 mg/mL EPS_{KC27L} %76; 1 mg/mL inülin ise %67 oranında inhibisyon sağlamıştır. *E. coli* ATCC 11229 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesine karşı 0,5 mg/mL EPS_{KC27L} %79; 0,5 mg/mL inülin %68; 1 mg/mL EPS_{KC27L} %87; 1 mg/mL inülin %72 oranda antibiyofilm kapasitesi sergilemiştir. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu 0,5 mg/mL EPS_{KC27L} %66; 0,5 mg/mL inülin %51 ve 1 mg/mL EPS_{KC27L} %82; 1 mg/mL inülin %59 oranında engellemiştir. Bu sonuçlar test edilen patojenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerine karşı EPS_{KC27L}'nin ticari olarak kullanılan ve bitkisel kaynaklı inülininden daha etkili antibiyofilm etkisinin olduğunu göstermektedir (Çelik, 2018).

EPS_{KC27L}'nin antioksidan aktivitesi

EPS_{KC27L}'nin antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi, demir iyonu (Fe^{+2}) şelatlama yeteneği (%) ve süperoksit anyon radikali (O_2^-) süpürücü aktivitesi (%) ile değerlendirilmiştir. EPS_{KC27L}'nin (0,5 ve 1 mg/mL) DPPH radikalini süpürme etkisi (%73,4 ve %79,6), süperoksit anyon radikali (O_2^-) süpürücü aktivitesi (%44,8 ve %61,6) ve demir iyonu şelatlama yeteneği (%18,6 ve %24,9) vardır. 0,5 mg/mL inülinin antioksidan aktivitesi bulunmazken, 1 mg/mL inülinin %73,2 DPPH radikalini giderme etkisi, %23,2 demir iyonu şelatlama yeteneği ve %32,3 süperoksit anyon radikali (O_2^-) süpürücü aktivitesi bulunmaktadır. Bu sonuçlar EPS_{KC27L}'nin inülininden daha etkin antioksidan kapasitesinin olduğunu göstermektedir (Çelik, 2018).

2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite

Genetik toksikoloji, DNA ile etkileşime giren, nükleik asitlerin veya bileşenlerinin değişikliğine neden olan, yapı ve/veya fonksiyonunda inaktivasyon ve/veya değişikliklere yol açan ajanların toksisitesinin araştırılmasıdır (Mosesso ve diğerleri, 2016). Genotoksik maddeler, aynı anda birden fazla DNA lezyonunu indükleyebilir. Örneğin, spesifik DNA lezyonlarını indükleyen alkilleyici ajanlar, eklenen DNA bazının yanlış kopyalanması yoluyla nokta mutasyonlarına neden olabilir. Ayrıca bu basit lezyonlar, hasarlı bazın kendiliğinden veya çeşitli DNA onarım mekanizmaları sonucunda kromozom kırıklarına, amplifikasyonlara, delesyonlara veya translokasyonlara neden olabilir. Bununla birlikte memeli hücreleri, belirli bir dereceye kadar koruma sağlayan DNA onarımı veya detoksifikasyon süreçleri gibi homeostatik mekanizmaya sahiptir (Brüsehaffer ve diğerleri, 2014).

Bazı genotoksik ajanlar, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı DNA'ya zarar verebilmektedir. Bu ajanlar, maruz kalan her birey için özellikle kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıkların oluşum riskini artırarak potansiyel sağlık problemlerine neden olabilirler. Maruz kalan birey üzerindeki etkisi, maruz kalma derecesine, genotoksik maddenin elimine edilme şekline ve bireyler arası genetik farklılıklara bağlıdır. Genotoksik ajanların mutasyon indüksiyonu için zararlı etkileri, onlara maruz kalan organizmada, hatta bazen ilk nesilde bile ortaya çıkmayabilir. Bunun yerine, bu zararlı etkiler sonraki nesillerde ortaya çıkabilir. Bazı genotoksik maddelerin düşük dozlarına uzun süre maruziyet,

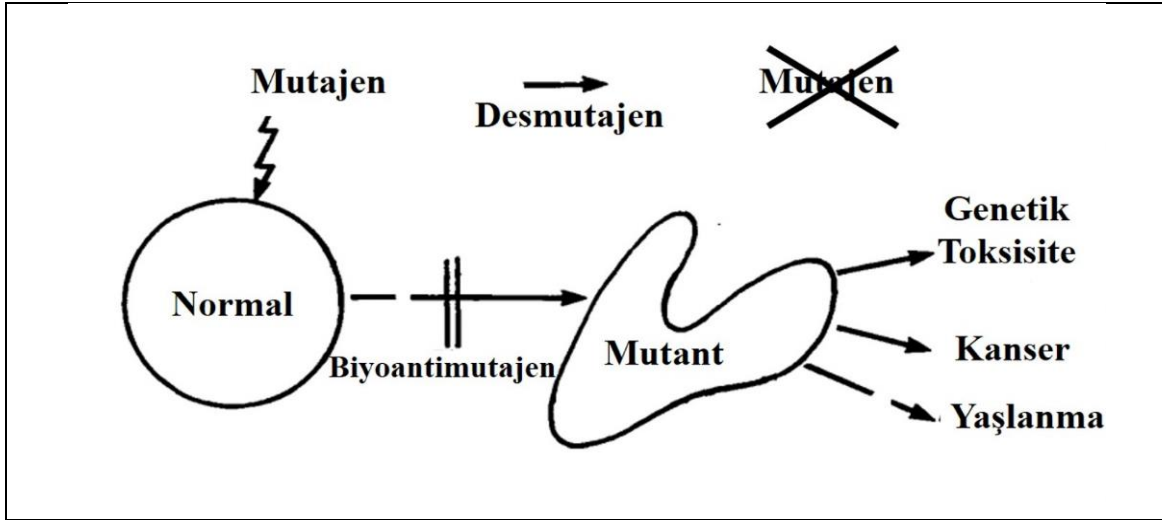
kromozomların yapısında görülmeyen ancak sonraki nesillere aktarılabilecek değişikliklere neden olabilir. Bu ajanların yüksek konsantrasyonları ölümcül veya toksik etkili iken, düşük konsantrasyonları kümülatiftir ve sonraki nesillerde aktive olarak ortaya çıkarılabilir (Velickova ve Milev, 2020).

Genetik hasarın indüksiyonu ve birikmesi; gen ekspresyonunun değişmesine, anormal hücre büyümesine, normal hücre fonksiyonunun bozulmasına neden olabilir. Mutasyonlar proto-onkojenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve/veya DNA tamiri genlerinde meydana gelirse genomik dengesizlik, karsinogenez ve çeşitli genetik hastalıkların oluşumu ile sonuçlanabilir. Hücrelerde DNA hasarının birikmesi sadece genotoksisite ve karsinogenezde değil, aynı zamanda erken yaşlanma, bağışıklık disfonksiyonu, infertilite, kök hücre disfonksiyonu, kronik inflamatuvar durumlar, metabolik sendromlar, hepatik bozukluklar, diyabet, artrit, kronik inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli kronik dejeneratif hastalıkların başlangıcında ve patogeneğinde de rol oynamaktadır (Kang ve diğerleri, 2013; Mosesso ve diğerleri, 2016; Turkez ve diğerleri, 2017).

Mutajenler, bir organizmanın genetik materyalinde değişikliklere neden olabilen kimyasal veya fiziksel ajanlardır (Ślarczyńska ve diğerleri, 2014). Mutajenlere maruziyetin azaltılması veya ortadan kaldırılması kanserin önlenmesinde oldukça önemlidir. Antimutajenler spontan ve/veya indüklenmiş mutasyonların sıklığını azaltan doğal veya sentetik ajanlardır (Ohta, 1993). Antimutajenler, desmutajenler ve biyoantimutajenler olarak sınıflandırılabilir. Etki mekanizmaları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

1- Desmutajenler; Mutajenleri hücrelere ve kalıtsal materyale ulaşmadan önce enzimatik veya kimyasal etkileşim yoluyla kısmen veya tamamen inaktive eden maddelerdir. Hücrelerin dışındaki mutajenlerin kimyasal veya biyokimyasal modifikasyonlarına neden olur, kimyasalların metabolik aktivasyonunu veya aktif mutajen formlarının oluşumunu engeller. Antioksidanlar genellikle mükemmel desmutajenlerdir (Kada ve diğerleri, 1986; Bhattacharya, 2011; Ślarczyńska ve diğerleri, 2014).

2- Biyoantimutajenler; Mutajenler hücre içine girdikten ve DNA hasarına neden olduktan sonra mutasyon sürecini bastırırlar. Hasarlı DNA'nın onarım ve replikasyon süreçlerine etki ederek mutasyon sıklığında azalmayı gerçekleştirirler (Kada ve diğerleri, 1986; Bhattacharya, 2011; Ślarczyńska ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.1. Antimutajenlerin iki farklı etki mekanizmasının şeması (Kada ve diğerleri, 1986).

2.5.1. Kemoprevansiyon

Kanser kemoprevansiyonu, karsinogenez veya tümör ilerlemesinin aşamalı süreçlerini önleyebilen, baskılayabilen veya geri döndürebilen sentetik veya doğal kimyasal maddelerin kullanımını ifade etmektedir. Doğal kemopreventif maddeler, mikrobiyal, deniz ve bitki kaynakları gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (Kelloff ve diğerleri, 1999; Vlaykova ve diğerleri, 2013).

Wattenberg (1985), kemopreventif ajanları inhibisyon aşamalarına göre bloke edici ajanlar ve baskılayıcı ajanlar olarak iki kategoride sınıflandırmıştır:

- 1- Blok edici ajanlar; Karsinogenlerin metabolik aktivasyonunu önleyerek, detoksifikasyon sistemlerini geliştirerek veya kritik hedef bölgeler ile etkileşime girmeden önce reaktif oksijen türlerini (ROS) yakalayarak kanserojen kaynaklı mutasyonları inhibe eden ajanlar
- 2- Baskılayıcı ajanlar; Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, yaşlanmasını ve/veya apoptozu etkileyerek tümör ilerlemesini önleyen baskılayıcı ajanlar (Wattenberg, 1985; Priyadarsini ve Nagini, 2012; Rashid, 2017).

Kanser ve mutasyonla ilişkili diğer hastalıkların önlenmesine yönelik farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Müdahalenin amacına bağlı olarak üç önleme seviyesi vardır. Bunlar sağlıklı

bireylere yönelik uygulanan biricil önleme, erken aşamadaki hastalara yönelik ikincil önleme ve tedaviden sonra uygulanan üçüncül önlemedir. Kemoprevansiyon esas olarak birincil ve ikincil önleme olarak düşünülebilir. Birincil önlemede amaç hastalığın oluşumunu engellemektir. Risk değerlendirmesi, risk faktörlerine maruziyeti önleme veya en aza indirme önemlidir. Bu seviyede reaktif türleri bloke etme, hücre bölünmesini inhibe etme, DNA yapısını koruma, DNA metabolizmasını ve onarımını modüle etme gibi hücre içi ve hücre dışı koruyucu mekanizmaları tetikleyerek mutasyonu ve kanser başlangıcını inhibe etmek mümkündür. Kanser gelişimi, genotoksik etkilerin engellenmesi, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitenin desteklenmesi, apoptoz ve sinyal iletim yollarının modüle edilmesi gibi mekanizmalarla önlenebilir. İkincil önlemede, lezyon tespit edildiğinde aynı mekanizmalar aracılığıyla ve bağışıklık sistemini etkileyerek kanser ilerlemesi inhibe edilebilir. Üçüncül önleme hastalığın tedavisinden sonra nüksetmeyi önlemeyi amaçlamaktadır. Kemoprevansiyonun klasik tanımının dışında olmasına rağmen benzer mekanizmalardan yararlanılmaktadır (De Flora ve Ferguson, 2005; López-Romero ve diğerleri, 2018).

2.5.2. Mutajenler

Mutajenler etki mekanizmalarına göre doğrudan ve dolaylı etkili mutajenler olarak sınıflandırılabilir. Doğrudan etkili mutajenler, metabolik aktivasyon veya herhangi bir moleküler modifikasyon gerektirmeden DNA hasarını indükleyebilirler. Bu ajanlar, elektrofilik grupları nedeniyle DNA ve diğer hücrel bileşenlerle doğrudan etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Ultraviyole (UV) ışık, kızılötesi (IR) ışık ve alkileyici ajanlar bu tip etkilere sahip mutajenlerdir. Dolaylı etkili mutajenlerin, genotoksik etkilere neden olabilmesi için biyoaktivasyon ile kanserojen metabolit veya reaktif ara maddelere dönüşmesi gerekmektedir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), heterosiklik aromatik aminler, nitrozaminler ve mikotoksinler gibi nispeten aktif olmayan ana bileşiklerdir (Barnes ve diğerleri, 2018).

Alkileyici ajanlar, alkil karbon gruplarını biyolojik moleküllere aktararak yapılarını değiştiren ve işlevlerini bozan reaktif kimyasallardır. Çevresel kaynaklarda (tütün dumanı, yakıt yanma ürünleri, kirleticiler, ilaçlar gibi) ve canlı hücrelerde (oksidatif hasarın yan ürünleri gibi) bol miktarda bulunduklarından maruz kalmak kaçınılmazdır (Fu ve diğerleri, 2012). Alkileyici ajanlar sitotoksik, mutajenik ve teratojenik etkiler nedeniyle insan sağlığı

için önemli tehditler oluşturmaktadır. Buna rağmen bazı alkilleyici ajanlar kanser hücrelerini öldürmek amacıyla kemoterapötik ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sonuç olarak bu ajanlar hem kansere neden olabilmekte hem de kanser tedavisinde kullanılabilmektedir (Fu ve diğerleri, 2012). DNA, alkilasyonun ana hedeflerinden biridir ve alkilleyici ajanın yapısına bağlı olarak tercih edilen alkilasyon bölgeleri bulunmaktadır. Bu ajanların sitotoksik etkisi, esas olarak DNA replikasyonu ve/veya transkripsiyon gibi temel DNA süreçlerini bozabilen DNA bazlarının alkilasyonundan kaynaklanmaktadır (Puyo ve diğerleri, 2014). Ayrıca toksik ve mutajenik lezyon oluşumuna neden olan DNA'daki diğer azot ve oksijen atomlarını da modifiye edebilirler (Fu ve diğerleri, 2012).

Mitomisin-C (MMC), *Streptomyces caespitosus* suşlarından izole edilen bir antibiyotiktir. Klinik olarak çeşitli kanserlerin (mide, pankreas, kolon, meme, akciğer ve mesane) tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Sağladığı çeşitli klinik faydaların yanı sıra nefrotoksisite, kardiyotoksisite ve genotoksisiteyi de indükleyebilmektedir. Doğrudan etkili mutajen olan MMC'nin sitotoksitesinin ana nedeni, sarmallar arası MMC-DNA çapraz bağlarıdır. MMC-guanin eklentilerine neden olan alkilasyon yoluyla DNA'da hasara neden olmaktadır (Brüshafer ve diğerleri, 2014; Puyo ve diğerleri, 2014; Bzeouich ve diğerleri, 2016; Rjiba-Touati ve diğerleri, 2016). Memeli hücrelerinde seçici DNA sentezi inhibisyonu, kromozom kırılması ve kardeş kromatid değişimi dahil olmak üzere çeşitli spesifik biyolojik etkilere sahiptir (Tomasz, 1995). Oksidatif stres, MMC kaynaklı toksisitede yer alan mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (Turkez ve diğerleri, 2012).

Başta metilleyici ve etilleyici ajanlar olmak üzere basit alkilleyici ajanlar, genellikle çevresel kirleticiler olarak kabul edilmez. Ancak birçok alkil kanserojenin reaktif formları için model bileşiklerdir (Beranek, 1990). Metil metansülfonat (MMS), çözücü, böcek ilacı ve kemoterapötik ajan olarak tercih edilmektedir (Jenkins ve diğerleri, 2005). Neoplastik ve mutajenik aktiviteleri olan tek işlevli ve doğrudan etkili bir alkilleyici ajandır (Madrigal-Bujaidar ve diğerleri, 1998). DNA ve amino asitlerin nükleofilik bölgelerini, özellikle azot atomlarında metile eder ve bazlarda neden olduğu bu tautomerik değişimlerle etkisini gösterir (Jiang ve diğerleri, 1999; Franke ve diğerleri, 2005a; 2005b). N-glikozidik bağın parçalanarak abazik (AP) bir bölge oluşumuna, bazlarda yanlış eşleşmeye ve replikasyonu engelleyecek bloklara neden olur (Beranek, 1990; Gichner, 2003; Chatterjee ve Walker, 2017). Ayrıca oksidatif stres ile DNA hasarını indüklediği de bildirilmiştir (Qureshiet ve

diğerleri, 1989; Lackinger ve diğerleri, 2001; Siddique ve diğerleri, 2019). MMS, oksitleyici ajanlar, asitler, alkaliler ve aşırı ısı gibi kararsızlaştırıcı faktörlerin yokluğunda, kararlı bir molekül gibi davranır (Khan, 2019). MMS ve diğer alkilleyici ajanların neden olduğu DNA hasarı, baz eksizyon onarımı (BER) yolları ile düzeltilebilir. Bu nedenle hücrelerin MMS'e duyarlılığı, DNA onarım mekanizmalarının etkinliğinin azalmasıyla önemli ölçüde artar (Fernandes ve diğerleri, 2018; Khan, 2019).

Serbest radikaller, diğer moleküller ile kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça kararsız olan, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır (Poprac ve diğerleri, 2017). Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Serbest radikaller ve diğer türleri, insan vücudundaki normal temel metabolik süreçler, travma, iltihap, fagositoz, enfeksiyon, ısı yaralanması, hiperoksi, aşırı egzersiz sonucu, oksidatif fosforilasyon, fagositlerin aktivasyonu, serbest demir ve bakır iyonlarının salınması, elektron taşıma zincirlerinin bozulması oluşabilir. Ayrıca radyasyon, ozon, sigara, ilaçlar, toksinler, pestisitler, çevresel kirleticiler ve endüstriyel kimyasallar gibi harici kaynaklar nedeniyle de meydana gelebilir (Carocho ve Ferreira, 2013; Lobo ve diğerleri, 2010). Bu radikaller canlı sistemlerde hem yararlı hem de zararlı etkilere neden olabilir. Bu etkilerin hassas bir dengede olması organizmanın sağlığı için oldukça önemlidir. Patojenlerin makrofajlar ve fagositler tarafından öldürülmesini sağlamaktadır. Hücrelerde sinyal transdüksiyonu, gen transkripsiyonu ve hücredeki diğer aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Fizyolojik seviyelerde düzenleyici olan bu moleküller patolojik seviyelerde zararlı ve sitotoksiktir (Fang ve diğerleri, 2002; Asmat ve diğerleri, 2016). Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijen içeren kimyasal reaktif türlerdir. En önemli ROT'lar arasında hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroksil radikali ($\text{LOO}^\cdot$) gibi radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit (HClO) gibi radikal olmayan türler bulunmaktadır (Poprac ve diğerleri, 2017; Adesulu-Dahunsi ve diğerleri, 2018).

Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge, uygun fizyoloji için oldukça önemlidir (Lobo ve diğerleri, 2010). Serbest radikallerin aşırı üretimi, hücrelerin/dokuların oksidatif ve antioksidatif sistemleri arasında dengesizliğe neden olmakta, oksidatif stresle sonuçlanmaktadır. ROT'lar sinyal molekülü gibi davranarak veya mutasyona neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı; genomik instabiliteyi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu/inaktivasyonunu veya protoonkogenlerin ekspresyonunun indüklenmesine, hücresel taşıma mekanizmalarında

aksamalara, değiştirilmiş hücre sinyallerine, hücre döngüsü kontrolünde hatalara ve genel olarak azalmış biyolojik aktiviteye neden olmaktadır (Rani ve diğerleri, 2016). Ayrıca doğrudan veya dolaylı olarak astım, kronik bronşit, böbrek yetmezliği, romatizma, Alzheimer, Parkinson, Huntington, depresyon, katarakt, diyabet, hipertansiyon ve kanser gibi hastalıklara yol açmaktadır (Asmat ve diğerleri, 2016; Wang ve diğerleri, 2016).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), doğrudan bir moleküler oksidan olarak ve dolaylı olarak serbest radikal üretimi yoluyla oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türüdür. Hidroksil radikali ve diğer ROT'ların oluşumuna neden olarak lipitlere, proteinlere, karbondhidratlara ve nükleik asitlere oksidatif olarak zarar verir. Düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki göstermekle birlikte yara bakımı, venöz yetmezlik tedavisi, sivilce tedavisi gibi klinik alanlarda kullanılır. Bu dozlarda geçici semptomlara neden olurken yüksek dozlarında ciddi hasarlara neden olabilir (Murphy ve Friedman, 2019).

2.5.3. Genotoksisite testleri

Genotoksisite ve mutajenite analizleri; toksik kimyasallara (terapötik ilaçlar, kozmetikler, agrokimyasallar, böcek ilaçları, kirleticiler, endüstriyel bileşikler, gıda katkı maddeleri, doğal toksinler, ağır metaller ve nanomalzemeler vb) maruz kalma, sigara içme, tıbbi görüntüleme, beslenme ve yaşam tarzı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar (*Helicobacter pylori*, insan papilloma virüsü vb) gibi karmaşık çevresel faktörlerin etkilerinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir (Turkez ve diğerleri, 2017). Genotoksisite testleri kullanarak DNA hasarının ölçülmesi, karsinogenezi anlamak ve kanser insidansı riskini değerlendirmek için çok önemli bir yaklaşım olarak bilinmektedir (Kang ve diğerleri, 2013).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından belirlenen genotoksisite testlerinin temel amacı;

- 1, insanlarda kalıtsal hasarlara neden olabilecek maddeleri tanımlamak,
- 2, kanserojenlik verilerinin mevcut olmadığı durumlarda potansiyel genotoksik kanserojenleri tahmin etmek ve
- 3, kimyasal kanserojenlerin etki mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmak (EFSA, 2011).

Kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization - WHO) tarafından insanlarda genotoksisitenin değerlendirilmesi için kullanılan standart testler olarak kabul edilmektedir. Testlerin yönergeleri ise Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD) ve Uluslararası Genotoksisite Testi Çalıştayı (The International Workshops on Genotoxicity Testing - IWGT) klavuzlarında verilmiştir. Bu testler, DNA molekülündeki hasarın yanı sıra kalıtsal özelliklerin iletimi için son derece önemli olan ve karsinogenezin indüksiyonunda yer alan kromozomların yapısındaki ve sayısındaki değişiklikleri ortaya çıkarma yeteneğine sahiptir (Słoczyńska ve diğerleri, 2014; Velickova ve Milev, 2020).

Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik (KA) testi, kimyasalların genotoksisitesini belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Kültürlenmiş hücre hatları dahil birçok hücre tipinde uygulanabilir ancak genellikle kültürlenmiş, iğ inhibitörü (kolkisin, kolşemid gibi) sayesinde metafazda tutulan ve Giemsa boyası ile boyanan insan periferik lenfositlerinde değerlendirilir (Suspiro ve Prista, 2011; Mateuca ve diğerleri, 2012). Hücre hatları genellikle genetik olarak kararsızdır, kromozom veya kromozom parçalarını kendiliğinden kaybetme ve kazanma eğilimindedir. Bu nedenle mitojen ile uyarılan lenfositler gibi birincil diploid hücre kültürlerine kıyasla daha yüksek kendiliğinden oluşan kromozom anormallikleri gösterirler (Registre ve Proudlock, 2016). OECD klavuzlarına “Test Yönergesi 473” olarak eklenmiş olup genotoksisite çalışmalarında kullanımı uygun bulunmuştur (Corvi ve Madia, 2017).

Kromozomal anormallik içeren hücrelerde tespit edilen genetik hasarın, karsinogeneze neden olan hasarı yansıttığı varsayılmaktadır. Bu nedenle kromozomal anormallik testi, çevresel, mesleki ve genotoksik ajanlara maruz kalan popülasyonlarda genotoksisitenin ölçülmesi için yaygın olarak kullanılan, doğrulanmış biyobelirteçtir. Periferik lenfositler vücutta dolaştıkları için hücrelerde, dokularda veya vücut sıvılarında bulunan bir kanserojen veya metabolit miktarının ölçülmesini sağlar. Lenfositlerde yüksek yapısal anormallik sıklığı, artmış kanser riskinin öngörüsüdür ve son yıllarda raporlanan bağımsız prospektif kohort çalışmalarıyla desteklenmektedir (Natarajan, 2002; Mateuca ve diğerleri, 2006; Velickova ve Kamcev, 2014). Kromozomal anormallik testini, mesleki ortamlardaki genotoksisite ölçümü için kullanan bir kohort çalışmasında, radona maruz kalan bir grup

madencinin periferik kan lenfositlerindeki kromozom anormalliklerinin sıklığı ile kanser insidansı arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Kromozomal anormalliklerin sıklığında % 1'lik bir artışın, %64 oranında artan kanser insidansı ile ilişkili olduğu tahmin edilmiştir (Smerhovsky ve diğerleri, 2001). Yapılan çalışmalarda mutajenik ajanların KA frekansının artmasına neden olurken, antimutajenik ajanların bu frekansı azalttığı raporlanmıştır (Yılmaz ve diğerleri, 2009; Rajiv ve diğerleri, 2016; Erikel ve diğerleri, 2019).

Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimleri (KKD), kardeş kromatitler arasındaki bir lokusta DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişiminden kaynaklanmaktadır. Hücre döngüsünün S fazında, genel kromozomal morfolojiyi değiştirmeyen DNA kırılması ve onarım mekanizmasını içermektedir. Kromozom sayısında veya yapısında herhangi bir değişiklik söz konusu değildir (Suspiro ve Prista, 2011; Velickova ve Milev, 2020). Değişimlerin görünür hale gelmesi, hücrelerin bir timin analogu olan BrdU (Bromodeoksiüridin) ile muamelesi ile gerçekleşir. DNA'nın yarı korunumlu replikasyonu, iki replikasyonun ardından DNA'da BrdU içeren ve içermeyen bölgelerin oluşmasını sağlar. Ardından hücreler UV ışına maruz bırakılır ve Giemsa ile boyanır. Bu sayede BrdU içeren bölgeler açık renkte gözlenirken, içermeyen bölgeler koyu gözlenmektedir (German ve Alhadeff, 1994; Wojcik ve diğerleri, 2004). Kardeş kromatidlerin farklı boyanması birinci, ikinci, üçüncü ve sonraki bölünmelerin tanınmasını da sağlamaktadır. Bu sayede replikasyon indeksinin (Rİ) de belirlenmesinde kullanılabilir (Mourelatos, 2016).

KKD oluşumunun altında yatan biyolojik mekanizma tam olarak bilinmemektedir ve frekansındaki artışın önemi hakkında belirsizlik vardır. Bu nedenle OCED tarafından 2014 yılında test klavuzundan çıkarılmıştır (Ünal ve diğerleri, 2016). Hücre başına KKD sayısı, mitomisin-C, radyasyon gibi DNA'ya zarar veren genotoksik ajanlara maruziyet sonrasında doza bağlı şekilde artmaktadır. Bu nedenle KKD'nin DNA hasarında yanıt ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak artan KKD sıklığının kanser riski ile ilgili prediktif değeri belirlenmemiştir (Suspiro ve Prista, 2011; Mateuca ve diğerleri, 2012). Kanser ile tam bir ilişkisinin olmamasına rağmen KKD testi, DNA onarım çalışmalarında ve genetik toksikolojide *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanmaktadır (German ve Alhadeff, 1994; Eke ve Celik, 2008).

Mikronükleus (MN) testi

Hematolojik olarak Howell–Jolly cisimcikleri olarak da bilinen mikronukleuslar, genellikle eritrositlerde görülen nükleer kromatinin pürüzsüz, yuvarlak kalıntılarıdır. 1951'de anafazın geç evrelerinde ana çekirdekten atılan asentrik parçalarla ilgili olarak adlandırılmıştır (Krishna ve Hayashi, 2000; Kirsch-Volders ve diğerleri, 2003).

Mikronukleuslar, çekirdekten tamamen ayrılmış, nükleer bir zarla çevrili küçük, kromatin yapılarıdır. Asentrik kromozom fragmentlerinden veya anafazda geride kalan tüm kromozomlardan kaynaklanmaktadır. Çekirdek bölünmesi sırasında ortaya çıkarlar ve anafazda geri kalarak telofazdaki iki ana çekirdekten birine dahil olmazlar (Cao ve diğerleri, 2013; Hintzsche ve diğerleri, 2017).

Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus testi (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay; CBMN Assay) olarak da bilinen MN testi, hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan kromozomal anormallikleri, genom mutasyonlarını, sitostatik etkileri ve hücresel sitotoksiteyi değerlendirmek için tercih edilen yöntemlerden biridir. Hem kromozom kaybını hem de kromozom kırılmasını ölçmeyi sağlamaktadır (Hovhannisyan, 2010; Hintzsche ve diğerleri, 2017; Franzke ve diğerleri, 2020). Farmasötikler, tarım kimyasalları, gıda katkı maddeleri gibi birçok kimyasalın genotoksik etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır (Hayashi, 2016). Ayrıca genotoksite araştırmaları, genotoksik ajanlara maruz kalan popülasyonlarda moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarlarda yaygın olarak kullanılan önemli bir *in vivo* ve *in vitro* biyobelirteçtir. Herhangi bir ökaryotik hücreye uygulanabilir. Karyotip analizi gerektirmediği için kolay ve hızlı bir yöntemdir (Cao ve diğerleri, 2013; Araldi ve diğerleri, 2015). MN testi kromozomal instabiliteyi, DNA onarım kapasitesini, nükleer bölünme oranını, mitojenik yanıtı ve nekrotik ile apoptotik hücrelerin oluşumunu ölçmek için kullanılır (Fenech, 2006). Güvenilir olması ve tekrarlanabilirliği nedeniyle genel olarak insan ve memeli hücrelerinde genotoksitenin ölçülmesi için standart bir sitogenetik teknik haline gelmiştir. Test OECD klavuzlarında “Test Yönergesi 487” olarak yayınlanmış ve genotoksite testlerinde uygun kullanımlarını açıklamıştır (Cao ve diğerleri, 2013).

DNA hasarına neden olan bileşikler, kromozom kırılmasına (klastojenik etki) veya tam kromozom kaybına (anöjenik etki) neden olabilir. Pan-sentromerik DNA problemleri ile

ugulanan floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu ile genotoksik ajanın klastojenik veya anöjenik olduğu tespit edilebilir. Klastojenik ajanlar, kromozomun parçalanmasına neden olduğundan oluşan mikronüslarda sentromer bölgesi bulunmaz. Anöjenik ajanlar ise mitoz sırasında kromozomların ayrılmasında problem oluşturmaktadır. Bu nedenle oluşan mikronükleuslar tüm kromozom içerir, dolayısıyla sentromer bölgelerini bulundurur. Kromozomlara özgü problemlerin kullanıldığı FISH tekniklerinde ise, mikronükleuslarda hangi kromozomların veya kromozom parçalarının bulunduğu belirlenebilir (Suspiro ve Prista, 2011; Blomme ve Will, 2016).

Birçok çalışmada kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklarda artan mikronükleus sıklığı gösterilmiştir. Ayrıca, sağlıklı donörlerin periferik lenfositlerindeki yüksek mikronükleus frekanslarının genomik instabiliteyi ve yaşamın ilerleyen dönemlerinde kansere yakalanma riskini öngörücü bir rol oynadığını bilinmektedir (Bolognesi ve diğerleri, 2015). Ayrıca kemopreventif ajanların mikronükleus sıklığını azalttığı da birçok araştırma sonucunda raporlanmıştır (Di Sotto ve diğerleri, 2010; Pinto ve diğerleri, 2010; Cavalcanti ve diğerleri, 2021; Jagetia, 2021).

Comet testi

Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE: Single cell gel electrophoresis) olarak da isimlendirilen comet, Ostling ve Johanson tarafından 1984 yılında ilk kez nötr pH koşulları altında gerçekleştirilmiştir. 1988 yılında ise Singh ve arkadaşları bu yöntemi modifiye ederek alkali pH koşullarında uygulamışlardır. Comet testinin nötr versiyonu, DNA molekülü çift sarmallı yapı olarak korunduğu için DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesini sağlar. DNA-DNA / DNA-proteininin çapraz bağlanması, DNA göçünün azalmasına yol açtığından mevcut tek zincir kırıklarının tespit edilememesine neden olur.

Cometin alkali versiyonu ise tek zincir kırıklarının tespit edilmesi için kullanılmaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve arkadaşları, 1988; Calini ve diğerleri, 2002; Hovhannisyan, 2010; Karlsson ve diğerleri, 2015).

Comet, ökaryotik ve prokaryotik canlılarda *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilen ve hemen hemen her hücre tipinde kullanılabilen çok yönlü, kolay, ucuz, güvenilir ve hızlı bir tekniktir. Comet, DNA hasarı ve onarımı için temel araştırmalar, genotoksisite çalışmaları, çevresel

toksikoloji, biyo-izlem, moleküler epidemiyoloji, radyasyon biyolojisi, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları gibi birçok alanda DNA hasarını içeren süreçleri incelemek için kullanılır (Langie ve diğerleri, 2015; Augustyniak ve diğerleri, 2016; Glej ve diğerleri, 2016). Bu test Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından 2014 yılında diğer test yönergelerine ek olarak “Test Yönergesi 489” olarak dahil edilmiştir. Ayrıca FDA ve WHO tarafından insan biyoizlem çalışmalarında da kullanılabilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Singh, 2016).

Test, maruz bırakılan hücrelerin mikroskop lamı üzerinde agaroz jele gömülmesi ile başlar. Sonrasında hücre zarının, sitoplazmanın, histonların ve diğer çözünür proteinlerin parçalanması amacıyla lizis çözeltisinde bekletilir. DNA'nın çözülmesini sağlamak için elektroforez tamponunda bekletilir ve alkali koşullar altında elektroforezi gerçekleştirilir. Elektrik alanı, negatif yüklü hasarlı DNA'nın anoda doğru hareket etmesine neden olur. Bu, başı (sağlam DNA) ve kuyruğu (hasarlı DNA) olan ‘kuyruklu yıldız’ benzeyen bir görüntü ile sonuçlanır. Nötralizasyondan sonra, etidyum bromür gibi DNA'ya özgü bir boya ile boyanır ve bir görüntü analiz sistemi kullanılarak floresan mikroskobu ile analiz edilir. Görüntü analizi, her ‘kuyruklu yıldız’ için farklı parametreleri hesaplamaktadır, en sık kullanılan parametreler kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu (%kuyruk DNA'sı) ve kuyruk momentidir (Gyori ve diğerleri, 2014; Araldi ve diğerleri, 2015; Karlsson ve diğerleri, 2015).

2.6. Ekzopolisakkaritler ile Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları

Prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal kaynaklardan izole edilen EPS'lerin antigenotoksik, antimutajenik, antiklastojenik ve antioksidan özelliklerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Söz konusu çalışmalarda bu ekzopolisakkaritlerin önemli ölçüde sitotoksik, genotoksik, mutajenik ve klastojenik etkilerinin bulunmadığı saptanmıştır.

Probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* RJF4'dan izole edilen EPS'nin (1, 10, 100 ve 1000 µg/mL) MTT ve Alamar Blue testleriyle yapılan sitotoksisite çalışmalarında kanser hücresi hattına (MiaPaCa2-pankreas kanseri hücre hattı) spesifik olarak antiproliferatif etki gösterirken normal hücre hatları (L6 ve L929 fibroblast hücreleri) için toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, söz konusu EPS'nin sağlık alanında kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Dilna ve diğerleri, 2015).

Lactobacillus casei 01 suşundan elde edilen EPS'nin (5, 10, 50 ve 100 µg/mL, 24 saat) insan kolon kanser hücre hattında (HT29) proliferasyon üzerine etkileri ve insan bağırsak epitel hücre hattında (intestine 407) sitotoksik etkisi ile EPS'nin (10 ve 50 µg/mL, ön, eş ve geç zamanlı muamele) 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO; 0,03 µg/mL) sitotoksitesisi üzerine antisitotoksik etkisi MTT hücre canlılığı testi incelenmiştir. Buna göre EPS'nin en yüksek konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde antiproliferatif aktivite sergilerken, intestinal 407 hücre canlılığının EPS'nin diğer konsantrasyonlarından (5-50 µg/mL) etkilenmediği bulunmuştur. Ayrıca EPS'nin (10 ve 50 µg/mL, 12 saat, eş zamanlı muamele) 4-NQO'nin genotoksitesisi üzerine antigenotoksik etkileri comet testi kullanılarak analiz edilmiştir. EPS'nin kullanılan konsantrasyonlarda 4-NQO'nun neden olduğu DNA hasarını ve NQO kaynaklı sitotoksitesiyi engellediği görülmüştür. EPS'nin bloke edici ve biyoantisitotoksik etki gösterdiği raporlanmıştır (Liu ve diğerleri, 2011).

Bir EPS olan levan, gıda endüstrisinde stabilizatör, kıvam arttırıcı ve aroma verici olarak sıklıkla tercih edilmektedir. 2013 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada *Bacillus subtilis*'den elde edilen levanın Çin hamster ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) sitotoksik ve mutajenik etkileri MTT (Levan; 80, 160, 240, 320 ve 400 mg/mL, 24 saat) ve MN (Levan; 400 ve 1200 mg/mL, 24 saat) testleri ile incelenmiştir. Levanın sitotoksik ve mutajenik etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Bu bileşiğin güvenli olduğu ve bu çalışmanın yeni endüstriyel uygulamalara olanak sağlayacağı belirtilmiştir (Dos Santos ve diğerleri, 2013).

Mello ve diğerleri (2017) *Lasiodiplodia theobromae* kaynaklı lasiodiplodan (LS) ekzopolisakkaritin (LS; 5, 10 ve 20 mg/ kg vücut ağırlığı, 15 gün, oral) genotoksik ve doksorubisin (DXR; 15 mg/kg vücut ağırlığı, 14. gün, intraperitoneal)'e karşı antigenotoksik etkilerini Wistar ratlarının kan hücreleri ve hepatositlerinde comet, periferik kan hücreleri ile kemik iliği hücrelerinde de MN testleri ile araştırmıştır. Ayrıca 10 mg/ kg vücut ağırlığı LS, 15 mg/kg vücut ağırlığı DXR ve 10 mg/ kg vücut ağırlığı LS + 15 mg/kg vücut ağırlığı DXR uygulamalarının DNA hasarıyla ilgili genlerin (Nükleotit ve baz eksizyon tamiri, yanlış eşleme tamiri, çift zincir kırık tamiri, apoptoz ve hücre döngüsü) ifadesindeki değişiklikler PCR ile incelenmiştir. LS'nin tek başına bu genlerin ifadelerinde değişikliklere neden olmaması, DXR'nin neden olduğu ifade hatalarını da azaltmıştır. Kemopreventif potansiyeli olan LS'nin DNA hasarı oluşturmadığı ve DXR'nin neden olduğu DNA hasarını önemli derecede azalttığı saptanmıştır. Ancak, bu etkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır.

Spicer, Goldenthal ve Ikeda tarafından yapılan bir araştırmada (1999) kurdan EPS'sinin mutajenitesi, dört farklı test sisteminde değerlendirilmiştir. Ames testi, *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 ve TA100 suşlarında S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Kurdan değerlendirilen konsantrasyonlarının (50, 150, 500, 1500 ve 5000 µg/plate) sadece en yüksekinde (TA1538 hariç tüm suşlarda ve S9 yokluğunda) hafif mutajenite sergilemiştir. Fare lenfoma mutasyon deneyi de S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiş ve 312,5; 625; 1250; 2500 ve 5000 µg/mL konsantrasyonlarındaki kurdanın mutajenik aktivite sergilemediği gözlenmiştir. Kurdan MN testinde de (500, 1000 ve 2000 mg/kg) MN oluşumunu indüklememiştir. KA testi S9 varlığı ve yokluğunda, 24 ve 48 saatlik muamele süreleri ile Çin hamster yumurtalık hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu test sisteminde de kurdanın hiçbir konsantrasyonu (625, 1250, 2500 ve 5000 µg/mL) kromozomal anormalliğine neden olmamıştır.

Aureobasidium pullulans tarafından üretilen pullulanın mutajenitesinin Ames testi ile incelendiği bir çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA1535, TA98 ve TA1537 suşları kullanılmıştır. S9 varlığında ve yokluğunda 10, 100, 1.000 ve 10.000 µg/plate konsantrasyonlarında uygulanan pullulan mutajenik aktivite sergilememiştir (Kimoto ve diğerleri, 1997).

Yaraların iyileştirilmesinde etkili olan ve tıbbın farklı alanlarında da kullanılan bakteriyel selülozun genotoksik ve siklofosfamide (SF; 2 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) karşı antigenotoksik etkileri *in vivo* olarak MN testi ile araştırılmıştır. Erkek ve dişi İsviçre Webster farelerine oral veya intraperitoneal yoldan verilen bakteriyel selüloz (200 mg/kg vücut ağırlığı, 3 gün), uygulamanın ardından alınan kemik iliği hücrelerinde değerlendirilmiştir. Bakteriyel selülozun genotoksik etkisinin olmadığı ve SF'ye karşı antigenotoksik olduğu bildirilmiştir (Pinto ve diğerleri, 2016).

Botryosphaeria rhodina MAMB-05'ten elde edilen botryosphaera ezkopolisakkaritinin (BOT) sitotoksik, mutajenik, genotoksik ve koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada Çin hamster akciğer fibroblastları (V79) ve rat hepatokarsinom hücreleri (HTC) kullanılarak MTT, MN ve comet testleri gerçekleştirilmiştir. MTT testinde BOT'un on farklı konsantrasyonu (7,5; 15, 30, 60, 100, 150, 200, 300, 450, 600 µg/mL) değerlendirilmiş ve bu bileşiğin V79 hücrelerinde (3 saat) sitotoksik bir etkisinin olmadığı ancak HTC hücrelerinde (24 saat) 300 ve 450 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını uyardığı

saptanmıştır. MTT testinin sonuçları baz alınarak mikronükleus ve comet testleri için BOT'un üç farklı konsantrasyonu (7,5; 30 ve 100 µg/mL) incelenmiş ve BOT'un V79 (3 saat) ve HTC (24 saat) hücrelerinde genotoksik bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. BOT'un (7,5; 30 ve 100 µg/mL, 3 saat) V79 hücrelerinde doksorubisin (DXR; 0,75 µg/mL, 3 saat) ve hidrojen peroksit (H₂O₂; 1,70 µg/mL, 20 dakika) karşı, HTC hücrelerinde ise benzo[a]piren (B[a]P, 20 µg/mL, 24 saat) ve hidrojen peroksit (H₂O₂; 1,70 µg/mL, 20 dakika) karşı antimutajenik etkileri iki farklı muamele protokolü (eş zamanlı ve geç zamanlı muamele) kullanılarak MN testi ile değerlendirilmiştir. BOT'un kullanılan mutajenlerin neden olduğu klastojenik etkileri önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Kerche-Silva ve diğerleri, 2017). BOT ile gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise bu EPS'nin (75, 150, 300, 450 ve 600 µg/mL) Ames testi ile *Salmonella typhimurium*'un TA98, TA100, TA102, TA97a suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkisi araştırılmıştır. BOT'un aynı konsantrasyonlarının hidrojen peroksit (H₂O₂; 100 µg/mL) tarafından üretilen reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimini azaltma kabiliyeti, lenfosit kültürlerinde CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) probu kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca BOT'un üç farklı konsantrasyonu (7,5; 30,0 ve 100,0 µg/mL, 24 saat) normal ve tümör (Jurkat) insan T lenfosit kültürlerine tek başına ve metil metansülfonat (MMS; 10 µM, 4 saat) ile birlikte (eş ve geç zamanlı muamele) uygulanarak genotoksik ve antigenotoksik etkileri comet testi ile incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre BOT'un değerlendirilen konsantrasyonlarda mutajenik ve genotoksik olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte MMS'nin neden olduğu DNA hasarına karşı lenfositleri koruduğu belirlenmiştir ancak H₂O₂ tarafından üretilen reaktif oksijen türlerini azaltamamıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak botryosphaeranın terapötik bir ajan olarak kullanılmasının uygun olabileceğini açıklamışlardır (Malini ve diğerleri, 2016). Yine aynı mantardan elde edilen BOT'un (7,5; 15, 30 mg/kg vücut ağırlığı, 15 gün, gavaj) *in vivo* klastojenik ve siklofosfamide (SF; 50 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal, eşzamanlı muamele) karşı antiklastojenik etkilerinin incelendiği bir çalışmada fare periferik kan ve kemik iliği kullanılarak MN testi gerçekleştirilmiştir. Buna göre BOT'un klastojenik veya anöjenik aktivitesinin olmadığı ve SP'nin neden olduğu klastojenik etkiyi önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle mikrobiyal polisakkaritlerin SP ile indüklenen klastojenik etki üzerindeki önleyici etkisinin, SP'nin reaktif hidroksil gruplarını temizlemesinden kaynaklandığı vurgulanmıştır (Miranda ve diğerleri, 2008).

Saccharomyces cerevisiae mayası tarafından üretilen (1→3)(1→6)-β-D-glukan'ın çin hamster epitel hücrelerinde (CHO-K1) *in vitro* genotoksitesi comet; hücre canlılığı üzerine etkisi ise CM-G ve MTT hücre canlılığı testleri ile incelenmiştir. MTT testinde EPS'nin uygulanan konsantrasyonlarından (6,25; 12,5; 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL; 3 ve 24 saat) sadece en yükseklerinin mitokondriyal etkinliği azaltarak sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Comet testinde çalışılan konsantrasyonlarının (12,5; 25, 50, 100 µg/mL) genotoksik etkiye neden olmadığı bulunmuştur. CM-G ile yapılan hücre canlılığı testinde ise uygulanan konsantrasyonların (12,5; 25, 50, 100, 200 µg/mL) kontrole kıyasla canlılık, apoptoz veya nekroz indekslerinde değişikliğine neden olmadığı saptanmıştır (Magnani ve diğerleri, 2009). Aynı mayadan üretilen β-glukanın (100, 150 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı) tek başına genotoksik ve siklofosfamid (CP; 50 mg/kg vücut ağırlığı) kaynaklı DNA hasarına karşı antigenotoksik etkisinin değerlendirildiği farklı bir çalışmada farelerde comet ve MN testleri uygulanmıştır. β-glukan altı hafta boyunca haftada üç ardışık gün uygulanmıştır. CP ise uygulanan gruplarda haftada bir kez verilmiştir. Birinci, beşinci ve altıncı haftada kan örnekleri alınarak testler gerçekleştirilmiştir. β-glukanın sadece en yüksek konsantrasyonunun genotoksik etkide olduğu bulunmuştur. Ayrıca antigenotoksik etkisinin varlığının konsantrasyona bağlı olmadığı tespit edilmiştir. Antigenotoksik etkisinin değerlendirilmesi için test protokolü beşinci ve altıncı haftada tekrar uygulanmıştır. Bu aktivitenin beşinci haftada azalmaya başladığı ve altıncı haftada görülmediği sonucuna ulaşılmıştır. Sonuç olarak β-glukanın DNA hasarını önleme etkisinin tedavi süresi uzatıldığında azaldığı saptanmıştır (Oliveira ve diğerleri, 2013). Oliveira ve diğerleri (2013) tarafından gerçekleştirilen yine β-glukanın genotoksik etkisinin ve antigenotoksik etki mekanizmasının aydınlatılması için yapılan bir çalışmada Çin hamster yumurtalık hücre hatlarının yabanil tipi (CHO-K1) ve DNA onarım mekanizması eksik tipi (CHO-xrs5) kullanılmıştır. Antigenotoksikite çalışmasında, DNA hasarını indükleyici ajan olarak da metil metansülfonat (MMS; 37,6 ve 4,23 µg/mL) kullanılmıştır. CHO-K1 hücre hattında gerçekleştirilen MN, comet ve hücre canlılığı testlerinde β-glukanın (5, 10, 20 ve 40 µg/mL) genotoksik ve klastojenik etkinliğinin olmadığı, hücre canlılığı indeksinde bir azalmaya, nekrotik ve apoptotik indekslerde de artışa neden olmamıştır. β-glukan, MN testinde DNA hasarına karşı önleyici aktivite gösterirken, comet testinde antigenotoksik aktivite göstermemiştir. Ayrıca hücre canlılığı testinde apoptozu düşürerek hücre canlılığını arttırmıştır. β-glukanın en yüksek konsantrasyonu ile (40 µg/mL) CHO-xrs5 hücrelerinde MN ve hücre canlılığı testleri gerçekleştirilmiştir. Comet testi, β-glukanın klastojenik etkide olmadığını ve MMS'ye etkili olduğunu göstermiştir. Hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz

parametrelerinin değerlendirildiği test sonucunda apoptoz indeksinde azalmaya bağlı hücre canlılığı indeksinde artış görülmüştür. β -glukanın koruyucu etkisini, MMS ile bağlanma yoluyla ve DNA onarım mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmüştür (Oliveira ve diğerleri, 2007).

İnsan diyetinde kullanılan inülinin (50 mg/kg vücut ağırlığı, oral, 12 hafta) genotoksik ve antigenotoksik etkileri, İsviçre erkek farelerinde comet, MN ve anormal kript odağı (ACF) testleri ile değerlendirilmiştir. Mutajen olarak 1,2 Dimetilhidrazin (DMH; 20 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) kullanılmıştır. Testler, ön (12 hafta inülin + 3. ve 4. hafta DMH), ön+sürekli (2 hafta inülin + 3. ve 4. hafta DMH), eş (3. ve 4. hafta inülin + DMH) ve geç zamanlı (3. ve 4. hafta DMH + son DMH'den 24 saat sonra inülin) protokolleri ile uygulanmıştır. MN testi, son muamelelerin ardından 24. (T1) ve 48. (T2) saatte, comet sadece 24. (T1) saatte, ACF testi ise 12. haftadan sonra tüm gruplarda gerçekleştirilmiştir. MN testi sonucunda inülinin mutajenik olmadığı, T1-geç zamanlı ve T2-eş zamanlı muamele protokolleri haricindeki tüm protokollerde %100'den fazla oranda hasar azaltabildiği gözlenmiştir. Comet testinde inülinin, genotoksik olduğu ve antigenotoksik etkide bulunmadığı görülmüş, nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. ACF testinde de inülinin tüm protokollerde antikarsinojenik aktivitede olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler, inülinin hem desmutajenik hem de biyoantimutajenik aktivite sergilediğini ve biyoantimutajenik aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Mauro ve diğerleri, 2013).

Bu tez çalışmasında probiyotik bir bakteri olan *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}) insan periferik lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve mitomisin-C (MMC), metil metansülfonat (MMS) ile hidrojen peroksit (H₂O₂) mutajenlerinin oluşturduğu hasarlara karşı antigenotoksik etkileri ilk kez araştırılmıştır. Bu amaçla kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca taramalı elektron mikroskopunda (*Scanning Electron Microscope*, SEM) EPS_{KC27L}'nin yapısı, EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamalarının hücrelerde değişikliğe neden olup olmadığı incelenmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}) *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkileri kültüre edilmiş insan periferik lenfositleri ve izole edilmiş insan lenfositleri kullanılarak incelenmiştir. Genotoksik etki için, EPS_{KC27L}'nin tek başına farklı konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Antigenotoksik etkisi için ise, EPS_{KC27L}'nin bir oksidan olan hidrojen peroksit (H₂O₂), antitümöral ajanlar olan metil metansülfonat (MMS) ve mitomisin-C (MMC) mutajenleri ile eş muameleleri sonucu oluşturulan genetik hasarlara karşı etkileri gözlemlenmiştir. Bu amaçla periferik kan örnekleri bir kadın ve bir erkek donörden temin edilmiştir. Donörlerde aranan özellikler;

- a. Sigara ve alkol kullanmaması
- b. Son altı ayda herhangi bir ilaç kullanmamış olması
- c. Herhangi bir sağlık sorununun olmaması
- d. 18-27 yaş aralığında olması

Araştırma, Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20/06/2019 tarihli 6/36 karar sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca araştırma, "Dünya Tabipleri Birliği Helsinki Bildirgesi İnsanlar Üzerinde Yapılan Tıbbi Araştırmalarla İlgili Etik İlkeleri'ne uygun hazırlanmış olup çalışmaya katılan gönüllülere "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatılmıştır. Araştırmada, T.C. Sağlık Bakanlığı'na 13 Kasım 2015 tarihinde yürürlüğe konulan İyi Klinik Uygulamaları (İKU) Kılavuzunda belirtilmiş olan temel prensiplere uyulacağı ve elde edilecek bilgilerin gizli tutulacağı taahhüt edilmiştir.

3.1.2. Test materyali

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkarit (EPS_{KC27L})

Bu tez çalışmasında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ danışmanlığında Kübra ÇELİK

tarafından hazırlanan “Tavuk dışkılarından izole edilen laktik asit bakterileri ekzopolisakkaritlerinin antioksidan ve antibiyofilim aktiviteleri” adlı tez çalışmasında serbest dolaşan tavukların gaitalarından elde edilen *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen EPS (EPS_{KC27L}) kullanılmıştır. Araştırmacılar tarafından EPS liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilmiş ve kapaklı şişelerine aktarılmıştır. Söz konusu ekzopolisakkaritin içeriğinin aşağıdaki gibi olduğu belirtilmiştir (Çelik, 2018):

Şeker kompozisyonu: %52,99 glikoz, %18,51 sükroz, %13,81 mannoz ve %14,67 arabinoz
Moleküler ağırlığı: $1,6 \times 10^3$ - $6,4 \times 10^4$ Da

EPS_{KC27L}, otoklavlanarak steril edilmiş, distile suda 100,00 µg/mL konsantrasyon olarak hazırlanmış olup 50-60°C’de suda çözülmüştür. Daha sonra 12,50; 25,00 ve 50,00 µg/mL’lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

Mitomisin-C (MMC)

Biyolojik kaynak: *Streptomyces caespitosus*

Kimyasal adlandırması: 6-amino-4,7-diokso-8-metoksi-5-metil-1,1,2,8,8,8-hekzahidroazirin [2,3] pirolo [1,2] indol-8-metilkarbamat

Molekül ağırlığı: 334,33 g/mol

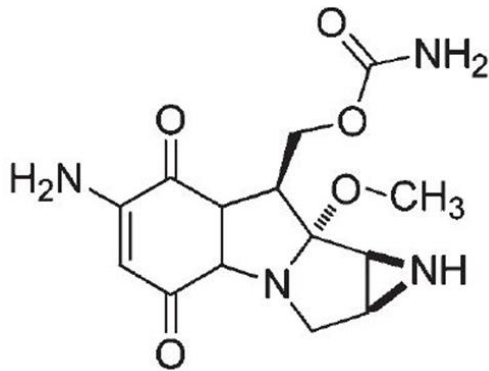
Molekül formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

CAS No: 50-07-7 (Sigma-Aldrich)

Safılık: %98

Etki: antitümör ve antibiyotik aktiviteye sahip, alkilleyici kemoterapi ajanı

Yapısal Formülü: Şekil 3.1.’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Mitomisin-C’nin yapısal formülü (Hanson ve diğerleri, 2012)

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Molekül ağırlığı: 34,01 g/mol

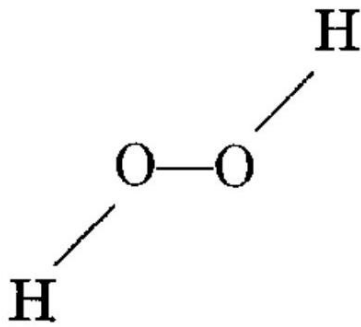
Molekül formülü: H₂O₂

CAS No: 7722-84-1

Safılık: %35

Etki: Organik ve/veya inorganik bileşikleri oksitleme yeteneği, DNA hasarı

Yapısal Formülü: Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Hidrojen peroksit'in yapısal formülü (Busing ve Levy, 1965)

Metil metansülfonat (MMS)

Molekül ağırlığı: 110.13 g/mol

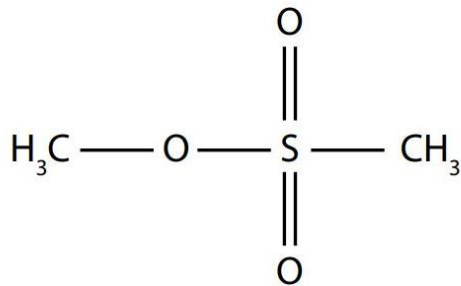
Molekül formülü: C₂H₆O₃S

CAS No: 66-27-3

Safılık: %99

Etki: Alkilleyici kemoterapi ajanı

Yapısal Formülü: Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Metil metansülfonat'ın yapısal formülü (Kumar ve diğerleri, 2011)

3.2. Metot

Araştırmada kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişim (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri uygulanmış olup izole insan lenfositleri ile de comet testi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca taramalı elektron mikroskopunda (*Scanning Electron Microscope*, SEM) EPS_{KC27L}'nin yapısı ve hücreler ile etkileşimi incelenmiştir.

3.2.1. EPS_{KC27L} Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bu araştırmada kullanılan konsantrasyonların belirlenmesi için ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla kültüre edilmiş insan periferik lenfositlerinde 3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00; 150,00 ve 200,00 µg/mL konsantrasyonları denenmiştir. Mitotik indeks incelemesi sonucunda 150,00 ve 200,00 µg/mL konsantrasyonları, hücre proliferasyonunu azalttığı için elenmiş olup (Çizelge 3.1), çalışmada kullanılacak konsantrasyonlar 12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/mL olarak seçilmiştir.

Çizelge 3.1. İnsan periferik lenfositlerinde EPS_{KC27L}'nin 48 saatlik muamelesi sonucunda tek donörde belirlenen mitotik indeks (Mİ) değerleri (Çalışılacak konsantrasyonların belirlenmesi için yapılan ön çalışma)

Konsantrasyon (µg/mL)	Mitotik İndeks (Mİ)
Kontrol	45
3,12	38
6,25	44
12,50	35
25,00	35
50,00	38
100,00	31
150,00	28
200,00	28

3.2.2. Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testlerinin preparatlarının hazırlanması

Kromozal Anormallik testi Evans, Kilbey, Legator, Nichols ve Ramel'in (1984) yönteminin modifikasyonlarıyla (Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal ve Aksoy, 2006) yapılmıştır. Kardeş

kromatid değişimi testi ise Perry ve Wolff'un (1974) yönteminin modifikasyonları (Speit ve Haupter, 1985) ile gerçekleştirilmiştir.

İki donörden heparinle yıkanmış enjektör ile alınan periferik kanın, 0,2 mL'si içerisinde 2,5 mL besi ortamı (Chromosome medium B) bulunan tüplere ekilmiştir. Kan ekilen tüplere, önceden sartorius membran filtre kullanılarak steril şartlarda hazırlanan BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiridin) solüsyonundan 10 µg/mL eklenmiştir. Sonrasında kültür tüpleri 37 °C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her tüpe kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) 0,06 µg/mL kolkisin çözeltisi eklenerek hücreler 37 °C'deki etüvde 2 saat boyunca kolkisin ile muamele edilmiştir.

Bu alışmada *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}) genotoksik ve antigenotoksik etkilerini incelemek için 3 deney protokolü oluşturulmuştur. Birinci deney protokolünde EPS_{KC27L}'nin olası genotoksik etkisi incelenmiştir. Bu amaçla yapılan ön denemeler sonucunda EPS_{KC27L}'nin seçilmiş farklı konsantrasyonları (12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. İkinici ve üçüncü deney protokollerinde ise EPS_{KC27L}'nin olası antigenotoksik etkileri incelenmiştir. EPS_{KC27L}'nin aynı konsantrasyonları, ikinci grupta 0,20 µg/mL mitomisin-C (MMC) nc grupta ise 5,00 µg/mL metil metansülfonat (MMS) ile birlikte eş zamanlı olarak hücrelere uygulanmıştır. Kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri için üç deney protokolünde de 24 saat ve 48 saatlik muamele süreleri uygulanmıştır. Ayrıca her uygulama grubuna, negatif (distile su) ve pozitif kontrol grupları (0,20 µg/mL MMC veya 5,00 µg/mL MMS) eklenmiştir.

72. saatte kültür tüpleri etüvden çıkarılarak 1100 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından kültür tüplerine hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) zeltiden 5 mL ilave edilmiş ve kültür tüpleri 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplere 3:1 oranında metanol:asetik asit ile hazırlanan fiksatif solüsyonu eklenmiştir. Ardından tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanarak fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Tüpün dibinde kalan süspansiyon pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu süspansiyon daha önceden temizlenmiş soğuk lamlar üzerine farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3. Mikronükleus (MN) testi preparatlarının hazırlanması

Mikronükleus (MN) testi, Fenech (2000, 2007)'in yöntemine göre bazı modifikasyonlarla (Palus ve diğerleri, 2003) uygulanmıştır. Donörlerden heparinle yıkanmış enjektörler ile alınan periferik kanın, 0,2 mL'si içerisinde 2,5 mL besi ortamı (Chromosome medium B) bulunan tüplere ilave edilmiş ve 37°C'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çalışmada *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}) insan periferik lenfosit kültüründe kromozom kırıkları ve/veya tüm kromozom kaybının olup olmadığını belirlemek ve mutajenlerin oluşturduğu kromozomal hasara karşı EPS_{KC27L}'nin etkinliğinin incelenmesi amacıyla 3 deney protokolü oluşturulmuştur. Kültür süresinin 24. saatinde birinci gruba EPS_{KC27L}'nin farklı konsantrasyonları (12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. İkinci gruba EPS_{KC27L}'nin aynı konsantrasyonları 0,20 µg/mL mitomisin-C (MMC) ile birlikte, üçüncü gruba ise 5,00 µg/mL metil metansülfonat (MMS) ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Mikronükleus (MN) testi için çalışmanın tamamında 48 saatlik muamele süresi baz alınmıştır. Her uygulama grubuna, negatif (distile su) ve pozitif (0,20 µg/mL MMC veya 5,00 µg/mL MMS) kontrol grupları eklenmiştir.

Sitokinezi bloke etmek amacıyla inkübasyonun 44. saatinde 5,2 µg/mL sitokalsin-B (Cyt-B) ilave edilmiştir. 72 saatlik kültür süresi tamamlandığında, kültür tüpleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplere soğuk hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) çözeltisi ilave edilmiş ve 4°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Ardından tüpler, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplere, 3:1 oranında metanol:asetik asit ile hazırlanmış soğuk fiksatif solüsyonu eklenmiştir. Ardından tüpler santrifüj edilerek süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Son fiksasyon uygulamasında son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilerek fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Tüpün dibinde kalan süspansiyon pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu süspansiyon daha önceden temizlenmiş soğuk lamalar üzerine farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.2.4. Preparatların boyanması

Yayılan ve kurutulan preparatlar mitotik indeks, kromozomal anormallik ve mikronükleusların incelenmesi amacıyla, %5'lik Giemsa boyası ile (pH=6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin incelenmesi ve replikasyon indeksinin belirlenmesi için preparatlara Speit ve Haupter'in (1985) metoduna göre bazı modifikasyonlarla floresan+Giemsa boyaması uygulanmıştır. Preparatlar düz bir tepsiye dizilmiş, üzerleri ince bir tabaka şeklinde fosfat tamponu (pH 6,8) ile kapatılmıştır. Sonrasında, UV lambası ile 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda 13 dakika boyunca ışınlanmıştır. Işınlanan preparatlar, saf suda yıkanmış ve önceden 60 °C sıcaklığa getirilmiş 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra preparatlar, %5'lik Giemsa boyasında (pH=6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Işınlanan ve boyanan preparatlar saf su ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında dik bir şekilde kurutulmuş ve mikroskopik inceleme için entellan ile daimi hale getirilmiştir.

3.2.5. Mikroskopik inceleme ve sonuçlarının değerlendirilmesi

Kromozom anormalliklerin (KA) belirlenmesi

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, her bir konsantrasyonda, her iki donör için hazırlanan ve daimi hale getirilen preparatlar incelenmiştir. Toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre) ile hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) sayısının belirlenmesi için donörlere ait preparatların her birinde kromozomları iyi dağılmış olan en az 100'er metafaz (her bir konsantrasyon için en az toplam 200 metafaz) incelenmiştir.

Kardeş kromatid değişimlerinin (KKD) belirlenmesi

Kardeş kromatid değişimi (KKD) sayılarının belirlenmesinde, donörlere ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren en az 25'şer hücre (bir konsantrasyon için en az toplam 50 hücre) incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testinde besi ortamı (Chromosome medium B) bulunan tüplere kan ile birlikte 10 µg/mL BrdU ekilmiştir. BrdU, DNA yapısındaki timin bazlarının analogudur ve DNA replikasyonu sırasında yeni sentezlenen komplementer iplikte timinin yerini almaktadır. UV ile ışınlanmış

ve boyanmış kromozomlarda, BrdU'i içine almış DNA bölgeleri açık renkli gözlenirken, BrdU içermeyen bölgeler koyu renkte gözlenmektedir. Oluşan renk farkı sayesinde DNA'da kardeş kromatidler arasındaki değişimler sayılmıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin sayılabilmesi için en az iki replikasyon döngüsü gereklidir. Kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD/hücre), bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir.

Replikasyon indeks (Rİ) değerlerinin belirlenmesi

Replikasyon indekslerinin (Rİ) hesaplanması için, donörlerden hazırlanan preparatların her birinden en az 100 hücre (bir konsantrasyon için en az toplam 200 hücre) incelenmiştir. Boyanma farkına göre birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitoz evresinde gözlemlenebilen hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi (Rİ) Eşitlik 3.1'deki gibi hesaplanmıştır. Eşitlikteki N, incelenen toplam hücre sayısıdır.

$$RI = \frac{[1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)]}{N} \quad (3.1)$$

Mitotik indeks (Mİ) değerlerinin belirlenmesi

Mitotik indekslerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, her bir konsantrasyonda, her iki donör içinde hazırlanan ve daimi hale getirilen preparatlar incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden hesaplanması ile mitotik indeks (Mİ) bulunmuştur. Bu amaçla tüm uygulamalar için hazırlanan preparatlardan en az 1000'er hücre (bir konsantrasyon için en az toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir.

Mikronükleus (MN) frekansının belirlenmesi

Mikronükleus (MN) frekansının belirlenmesi için 'binükleat' denilen çekirdek bölünmesini tamamlayan, ancak sitoplazma bölünmesinin engellendiği, çift çekirdekli hücreler değerlendirilmiştir. Binükleat hücreler, sitokinezi bloke etmek amacıyla, inkübasyonun 44. saatinde sitokalsin-B ilavesi ile elde edilmektedir. Binükleat hücreler, test edilen materyallerin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Bu nedenle, donörlere ait preparatların

her birinden 1000 adet (her bir konsantrasyon için en az toplam 2000 adet) binükleat hücrenin mikronükleus içerip içermediği incelenmiştir. Mikronükleus içeren binükleat hücreler, içerdikleri mikronükleus sayılarına göre; 1 mikronükleuslu (1MN), 2 mikronükleuslu (2MN), 3 mikronükleuslu (3MN) ve 4 ve daha fazla mikronükleuslu (4MN) olarak sayılmıştır. Hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) Eşitlik 3.2'teki gibi hesaplanmıştır. Eşitlikteki N, incelenen toplam hücre sayısıdır.

$$MN = \frac{[1 \times (1MN) + 2 \times (2MN) + 3 \times (3MN + 4MN)]}{N} \quad (3.2)$$

Nükleer bölünme indeks (NBİ) değerlerinin belirlenmesi

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) belirlenirken preparatların her birinden 500 hücre (toplam 1000) hücre incelenmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 ve daha fazla çekirdekli (4N) sayılmış, nükleer bölünme indeksi (NBİ) Eşitlik 3.3'teki gibi hesaplanmıştır. Eşitlikteki N, incelenen toplam hücre sayısıdır.

$$NBİ = \frac{[1 \times (1N) + 2 \times (2N) + 3 \times (3N + 4N)]}{N} \quad (3.3)$$

3.2.6. Comet testi

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}), insan periferik lenfositlerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı ve hidrojen peroksit (H₂O₂) mutajeni tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkisi olup olmadığı comet testi ile incelenmiştir.

Bu test Singh, McCoy, Tice ve Schneider'ın (1988) metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterlerini taşıyan donörlerden alınan periferik kanların 100'er µL'si, soğuk ortamda PBS ile karıştırılmış ve oluşan süspansiyonlardan, lenfositler biocoll çözeltisi kullanılarak soğuk ortamda izole edilmiştir. Hücre canlılığı, izole lenfositlere uygulanan trypan blue ile yapılan canlılık testi sonucu ≥ %98 olarak belirlenmiştir. EPS_{KC27L}'nin farklı konsantrasyonları (12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 µg/mL) tek başına ve H₂O₂ (100 µM) ile eş zamanlı olarak 1 saat, 37°C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Deneylerde bir negatif (distile su) ve bir de pozitif ($100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) kontrol grupları bulundurulmuştur. Sürenin sonunda, santrifüj işlemi uygulanmış, süpernatantlar uzaklaştırılmış ve PBS ile resüspanse edilmiştir. Lenfositler düşük erime ısıları agar ile karıştırılmış ve önceden hazırlanan yüksek erime ısıları agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır. Preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra lysing solüsyonuna alınarak 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında preparatlar elektroforez tamponunda 20 dakika bekletilmiş ve takiben 25 V, 300 mA’de 20 dakika elektroforez uygulanmıştır. Bu işlemlerden sonra lamalar nötralizasyon tamponunda (0,4 M Tris, pH=7,5) bekletilmiş ve ardından etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak incelemeye alınmıştır.

Comet değerlerinin belirlenmesi

Comet testinin değerlendirilmesinde her konsantrasyon için donör başına en az 100 olmak üzere toplam 200 hücre incelenmiştir. İnceleme 546 nm’lik bir uyarma filtresine ve 590 nm’lik bir bariyer filtresine sahip olan floresan mikroskopta (Olympus BX51), “Comet Assay IV” (Perceptive Instruments Ltd., UK) analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde değerlendirme 400x büyütmede gerçekleştirilmiş olup DNA hasarı dereceleri kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (μm) ve kuyruk momenti cinsinden yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel analizler

Kromozom anormallikleri (KA), Kardeş kromatid değişimi (KKD) ve Mikronükleus (MN) testleri için, bu testlere özgü hazırlanan veri takip çizelgeleri kullanılırken, comet testi için “Comet Assay IV” (Perceptive Instruments Ltd., UK) analiz sistemi aracılığı ile elde edilen veriler kayıt altına alınmıştır.

Uygulamalardan elde edilen sonuçlar, istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiş ve kontrol grupları karşılaştırılmıştır.

- Kromozomal anormallik (KA) testinde; toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre) ile hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) sonuçları z testi ile,
- Kardeş kromatid değişimi (KKD) testinde; kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD/hücre) t testi, replikasyon indeksi ($R\dot{I}$) z testi ile,

- Mikronükleus (MN) testinde; hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) z testi ile,
- Comet testinde; kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (μm) ve kuyruk momenti parametreleri t testi ile
- Mitotik indeks (Mİ) ise z testi ile analiz edilmiştir.
- Z testi sonucuna göre anlamlılık değerleri $p<0,05$; $p<0,01$ ve $p<0,001$ düzeylerinde değerlendirilmiştir.

Kontrollere kıyasla anlamlı değişim gösteren uygulama grupları için doz-cevap ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

3.2.8. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (*Scanning Electron Microscope*, SEM) çalışmasında, *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin ($\text{EPS}_{\text{KC27L}}$) yapısı, $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ ve $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$ uygulamalarının hücrelerde değişikliğe neden olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla çalışmaya dahil edilme kriterlerini taşıyan donörlerden alınan periferik kanın 200 μL 'si steril şartlarda, 2,5 mL'lik kromozom ortamına (Chromosome medium B) ekilmiştir. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin belirlenen farklı konsantrasyonları (12,50; 25,00; 50,00 ve 100,00 $\mu\text{g/mL}$) tek başına ve 0,20 $\mu\text{g/mL}$ mitomisin-C (MMC) ile eş zamanlı olarak hücre kültürlerine muamele edilmiştir. Ayrıca bir negatif (distile su) ve bir de pozitif (0,20 $\mu\text{g/mL}$ MMC) kontrol grupları eklenmiştir. Kültür tüpleri 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültür sonlandırmasının ardından numuneler 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra tüm uygulamalardan SEM'de inceleme için numuneler alınmıştır. Ardından kültür tüplerine hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) çözeltisinden 5 mL ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplere 3:1 oranında metanol:asetik asit ile hazırlanan fiksatif solüsyonu eklenmiştir. Tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanarak fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Fiksasyon işleminden sonra da tüm uygulamalardan SEM'de incelenmek için numune alınmıştır. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ yapısının incelenmesi için bu EPS'den numune alınmıştır. SEM incelemeleri için alınan tüm numuneler %2,5 Gluteraldehitte tespit edilmiştir (Altunbek ve diğerleri, 2019). Yükselen alkol serileriyle dehidrasyon (%50, 70, 90, 100'lük etil alkol) yapılmış ve amil asetattan geçirilmiştir. Polaron CPD 7501 Kritik nokta kurutma

cihazında karbondioksitle kritik noktada kurutma yapılmıştır. Kurutulmuş olan örnekler SEM staplarına yerleştirilip Polaron SC 502 sputter coater cihazında altınla kaplanmıştır. Daha sonra JEOL JSM 6060 LV SEM taramalı elektron mikroskopunda 10kV de incelenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. EPS_{KC27L}'nin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.1.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

24 ve 48 saat EPS_{KC27L} uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdıkları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

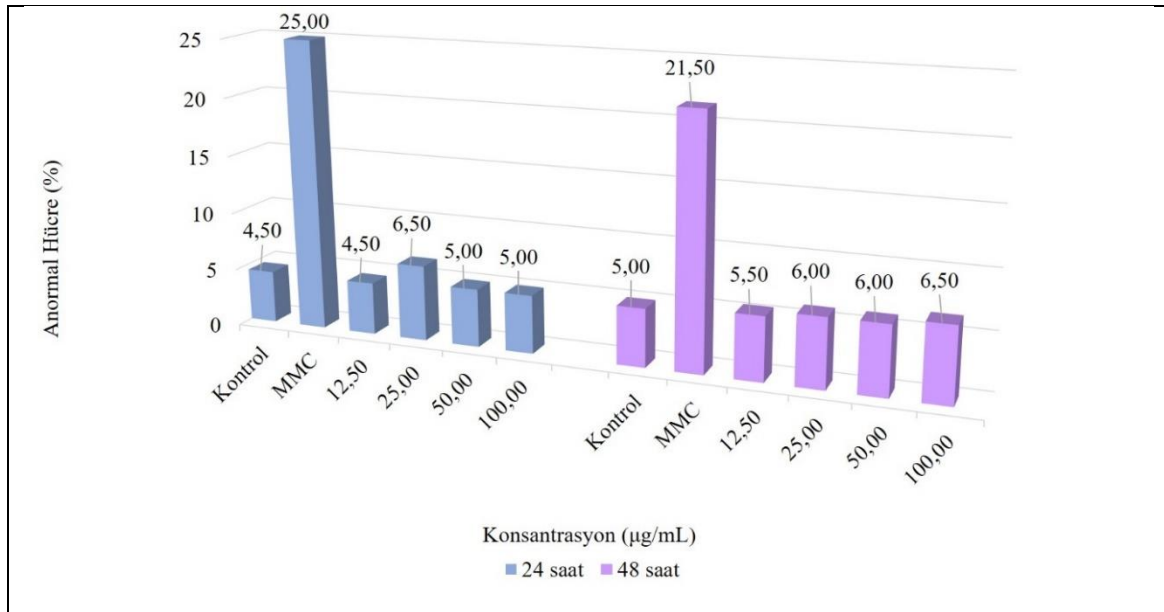
Uygulamalar sonucunda beş tip yapısal ve bir tip sayısal anormallik gözlenmiştir. Bu anormallikler, görülme sıklığına göre sırasıyla kromatid kırığı (%63,73), fragment (%12,09), kromozom kırığı (%10,99), kardeş kromatidlerde birleşme (%8,79) ve kromatid değişimi (%1,10) dir. Kromatid değişimine 12,50 µg/mL EPS_{KC27L}'nin 48 saatlik uygulamasında, disentrik kromozom ve halka kromozoma ise pozitif ve negatif kontrollerde rastlanmıştır. Sayısal anormalliklerden ise yalnızca poliploidi (%3,30) gözlenmiştir (Çizelge 4.1, Resim 4.1).

EPS_{KC27L} her iki uygulama süresinde de anormal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını kontrole göre anlamlı düzeyde arttırmamıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

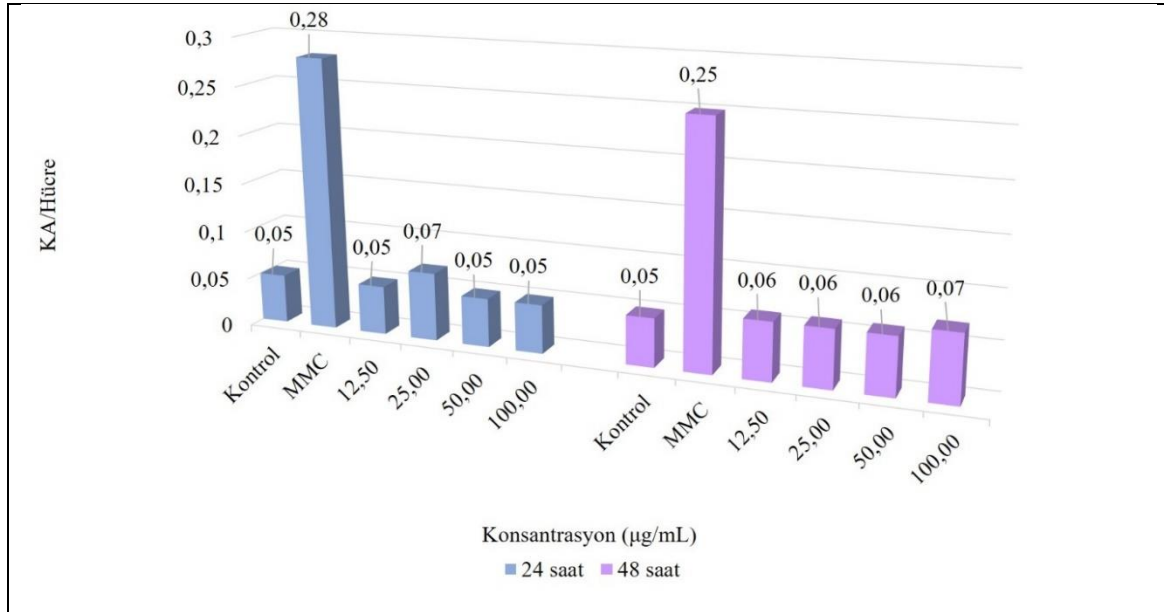
Çizelge 4.1. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları

Uygulama grubu	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal									
			ktk	kzk	f	kkb	ktđ	đs	h	p		
Kontrol	24	0,00	5	3	-	-	-	-	-	1	4,50 ± 1,47	0,05 ± 0,02
MMC	24	0,20	31	7	11	3	2	-	-	1	25,00 ± 3,06	0,28 ± 0,03
EPS _{KC27L}	24	12,50	5	2	1	-	-	-	-	1	4,50 ± 1,47	0,05 ± 0,02
		25,00	7	3	2	1	-	-	-	-	6,50 ± 1,74	0,07 ± 0,02
		50,00	6	1	1	2	-	-	-	-	5,00 ± 1,54	0,05 ± 0,02
		100,00	7	1	-	1	-	-	-	1	5,00 ± 1,54	0,05 ± 0,02
Kontrol	48	0,00	5	1	1	-	-	-	1	2	5,00 ± 1,54	0,05 ± 0,02
MMC	48	0,20	27	6	9	2	1	2	-	2	21,50 ± 2,90	0,25 ± 0,03
EPS _{KC27L}	48	12,50	7	-	-	2	1	-	-	1	5,50 ± 1,61	0,06 ± 0,02
		25,00	8	-	4	-	-	-	-	-	6,00 ± 1,68	0,06 ± 0,02
		50,00	8	2	2	-	-	-	-	-	6,00 ± 1,68	0,06 ± 0,02
		100,00	10	1	1	2	-	-	-	-	6,50 ± 1,74	0,07 ± 0,02
Kromozom al anormallik yüzdesi			63,73	10,99	12,09	8,79	1,10	0,00	0,00	3,30		

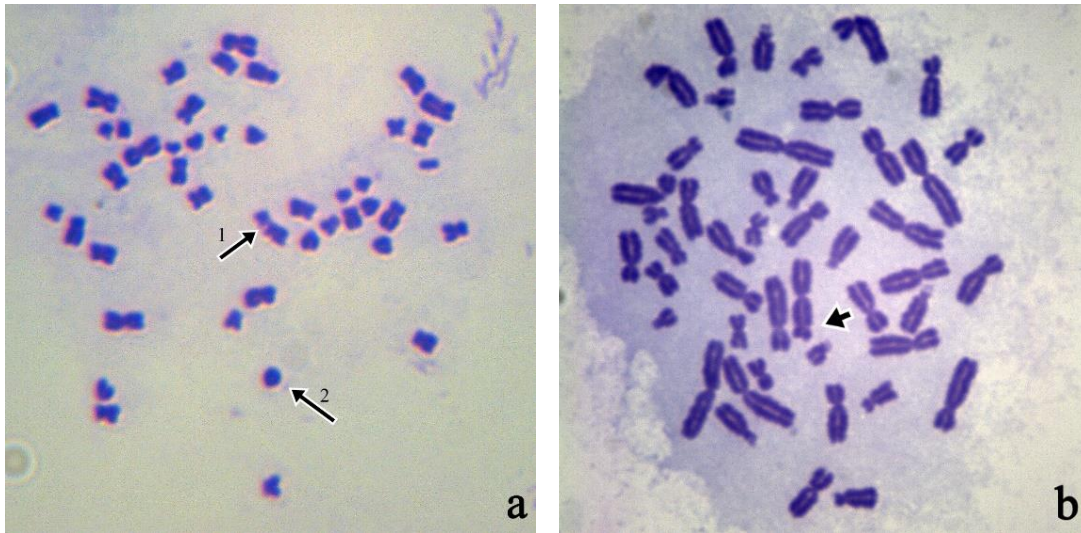
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, h: halka kromozom, p: poliploidi



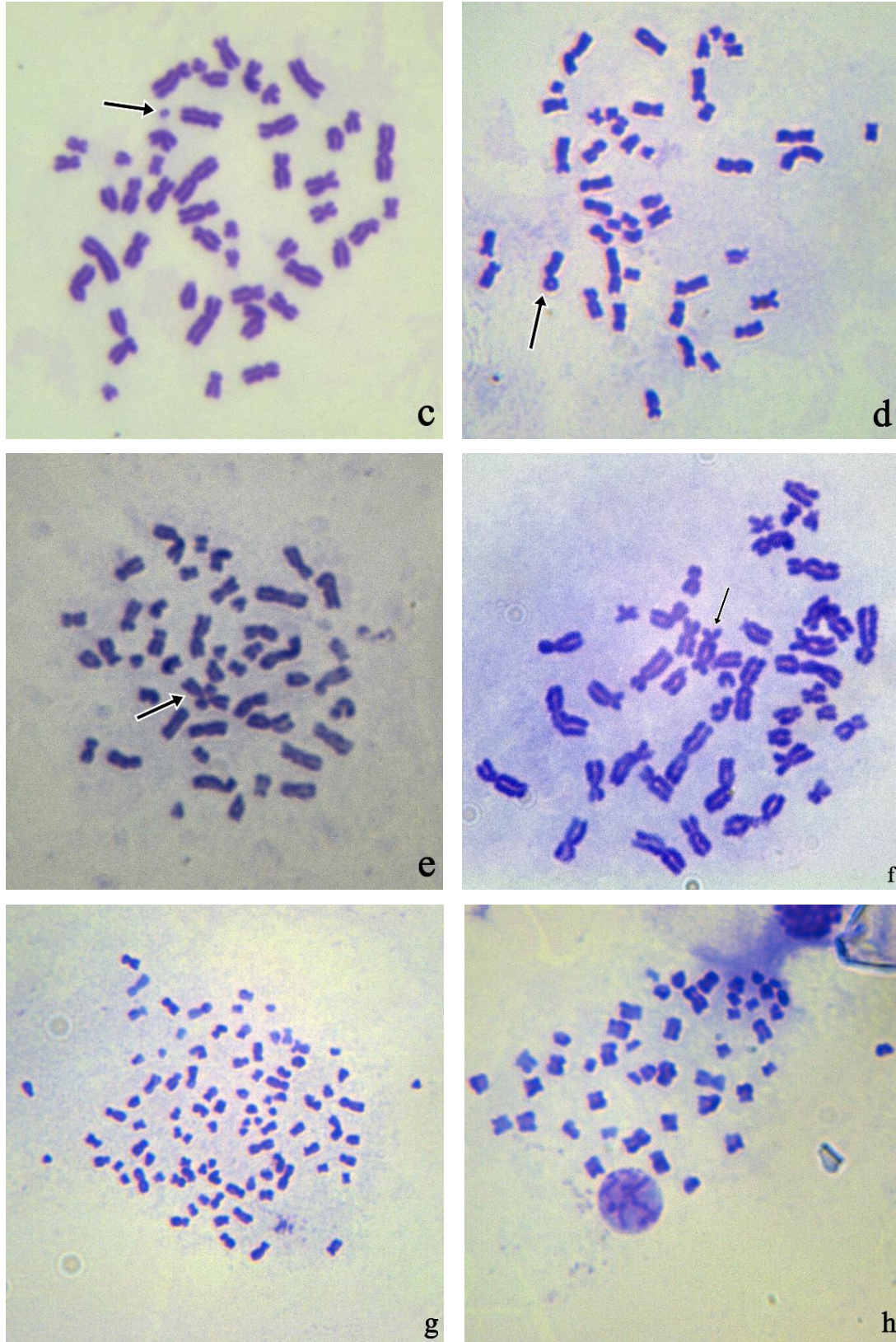
Şekil 4.1. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri



Şekil 4.2. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları



Resim 4.1. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler: a) 1. kromatid kırığı, 2. halka kromozom b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) kromatit değişimi f) disentrik kromozom g) poliploidi h) endoreduplikasyon



Resim 4.1. (devam) EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tiplerinden örnekler: a) 1. kromatid kırığı, 2. halka kromozom b) kromozom kırığı c) fragment d) kardeş kromatidlerde birleşme e) kromatit değişimi f) disentrik kromozom g) poliploidi h) endoreduplikasyon

4.1.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi

EPS_{KC27L}'nin tek başına uygulandığı 24 ve 48 saatlik kültür sonucunda gözlenen minimum-maksimum kardeş kromatid değişimleri, kardeş kromatid değişimi (KKD), değerlendirilen metafazlardan birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitozunu gerçekleştiren hücreler, replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Her iki muamele süresi baz alınarak uygulanan EPS_{KC27L} lenfositlerde minimum 2, maksimum 18 kardeş kromatid değişimine neden olmuştur. EPS_{KC27L}'nin kardeş kromatid değişim frekansı (KKD) ve replikasyon indeksi (Rİ) üzerine etkileri incelendiğinde her iki uygulama süresinde de hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı düzeyde değişikliğe neden olmamıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.3, Resim 4.2).

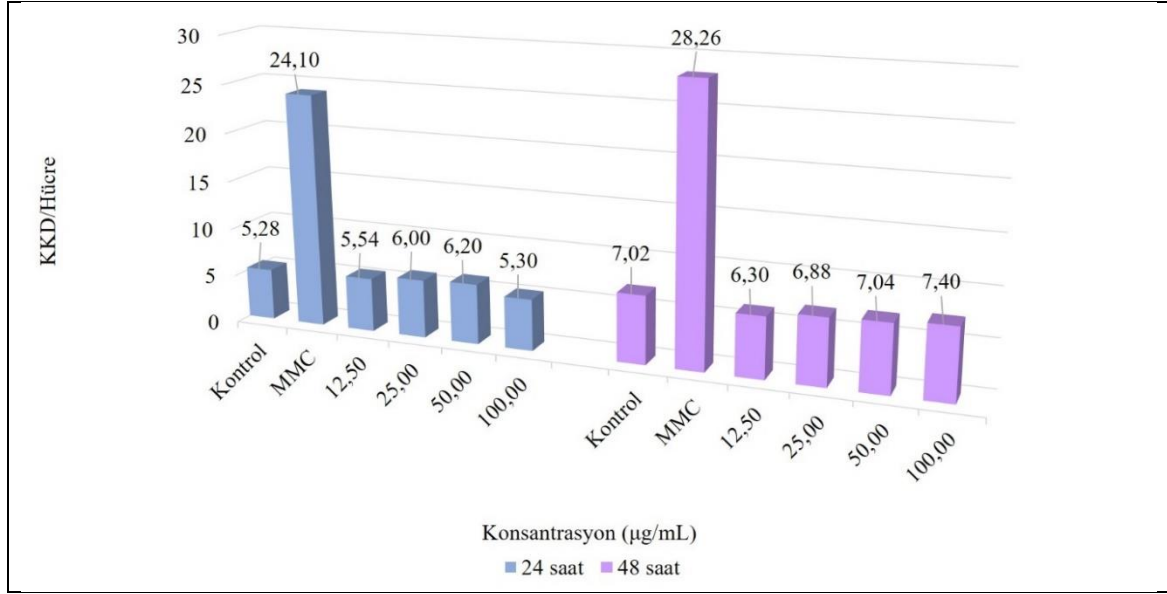
Mitotik indeks değerleri incelendiğinde, EPS_{KC27L}'nin tek başına uygulandığı test sisteminde 24 ve 48 saat muamelelerin her ikisinde de sadece en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) kontrole göre negatif korelasyon göstermiş (24 saat uygulama için $r=-0,79$ ve 48 saat uygulama için $r=-0,84$) ve istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2., Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri

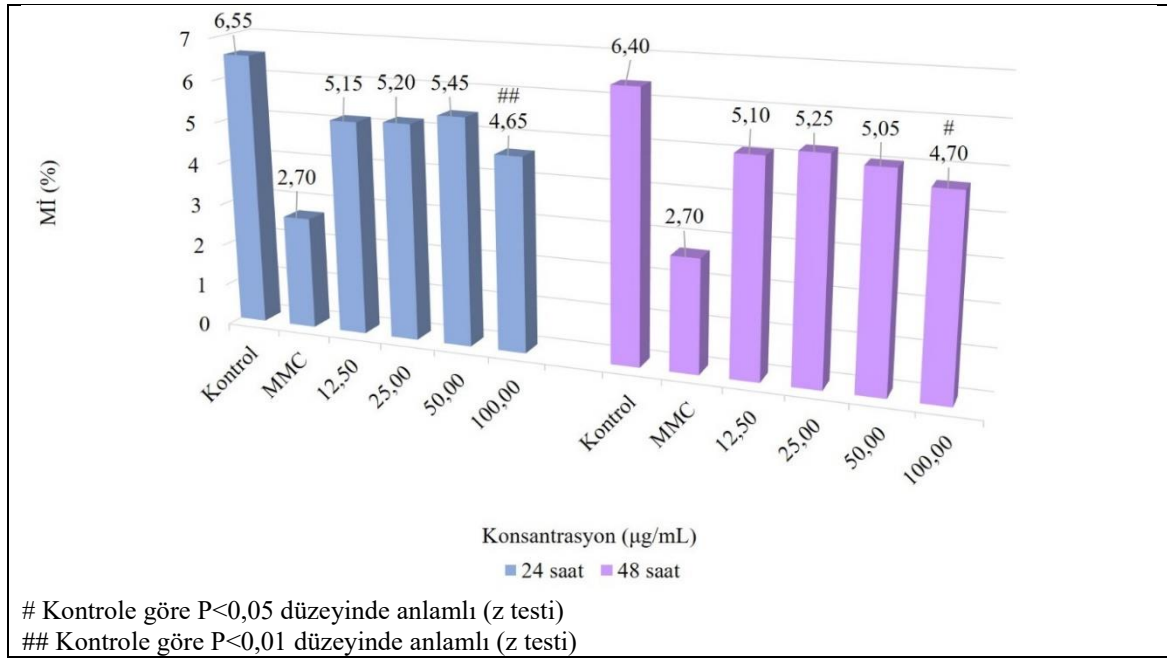
Uygulama Grubu	Uygulama		Min-Max KKD	KKD/Hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	Rİ $\pm$ SH	Mİ $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)							
Kontrol	24	0,00	0-14	5,28 $\pm$ 0,41	49	61	90	2,21 $\pm$ 0,06	6,55 $\pm$ 0,55
MMC	24	0,20	16-42	24,10 $\pm$ 0,89	95	56	49	1,77 $\pm$ 0,06	2,70 $\pm$ 0,36
EPS _{KC27L}	24	12,50	3-12	5,54 $\pm$ 0,27	50	63	87	2,19 $\pm$ 0,06	5,15 $\pm$ 0,49
		25,00	2-14	6,00 $\pm$ 0,35	52	62	86	2,17 $\pm$ 0,06	5,20 $\pm$ 0,50
		50,00	3-18	6,20 $\pm$ 0,40	70	57	73	2,02 $\pm$ 0,06	5,45 $\pm$ 0,51
		100,00	2-9	5,30 $\pm$ 0,24	58	64	78	2,10 $\pm$ 0,06	4,65 $\pm$ 0,47 ##
Kontrol	48	0,00	0-17	7,02 $\pm$ 0,47	56	54	90	2,17 $\pm$ 0,06	6,40 $\pm$ 0,55
MMC	48	0,20	14-54	28,26 $\pm$ 1,04	85	75	40	1,78 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,36
EPS _{KC27L}	48	12,50	3-12	6,30 $\pm$ 0,33	54	60	86	2,16 $\pm$ 0,06	5,10 $\pm$ 0,49
		25,00	3-14	6,88 $\pm$ 0,34	58	72	70	2,06 $\pm$ 0,06	5,25 $\pm$ 0,50
		50,00	3-14	7,04 $\pm$ 0,36	60	68	72	2,06 $\pm$ 0,06	5,05 $\pm$ 0,49
		100,00	2-15	7,40 $\pm$ 0,37	71	67	62	1,96 $\pm$ 0,06	4,70 $\pm$ 0,47 #

Kontrole göre $P<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

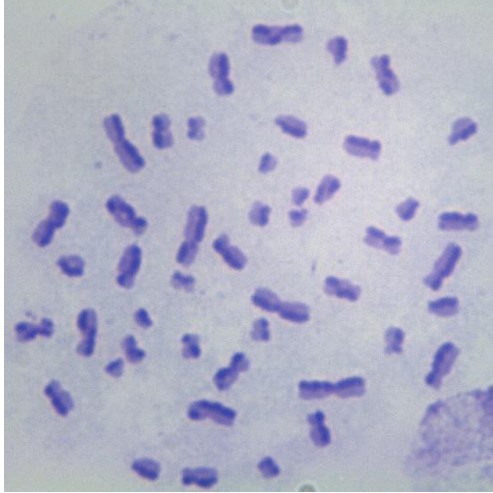
Kontrole göre $P<0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.3. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları



Şekil 4.4. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri



Resim 4.2. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferik lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri için örnek resim

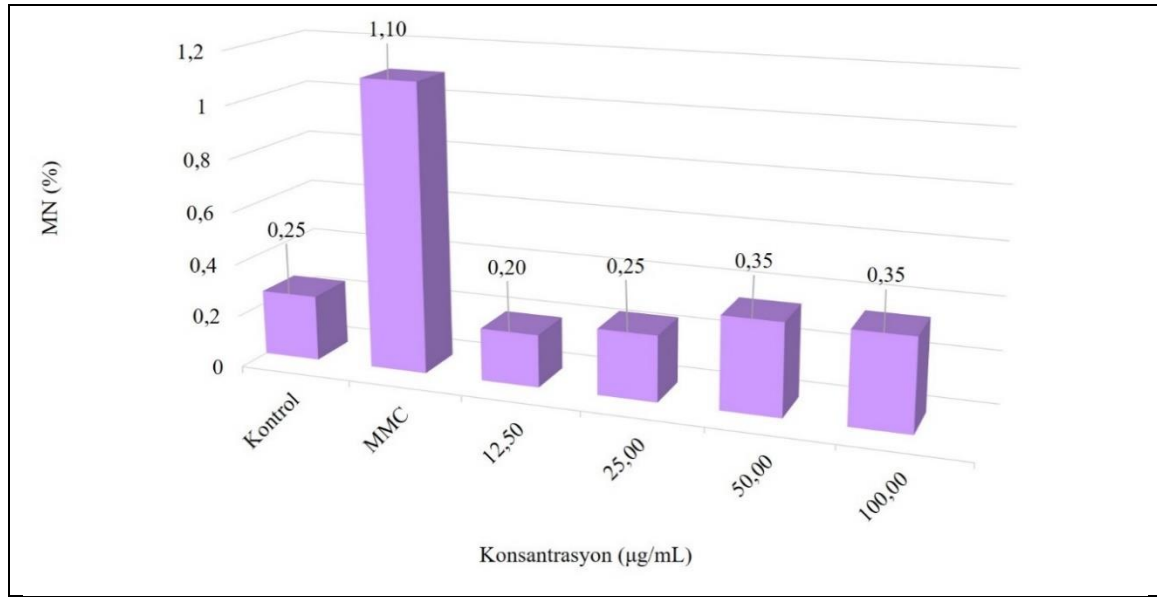
4.1.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi

48 saat boyunca EPS_{KC27L} ile kültüre edilen insan periferik lenfositlerinde gözlenen binükleat hücrelerdeki mikronükleus oluşumu, mikronükleus frekansı (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

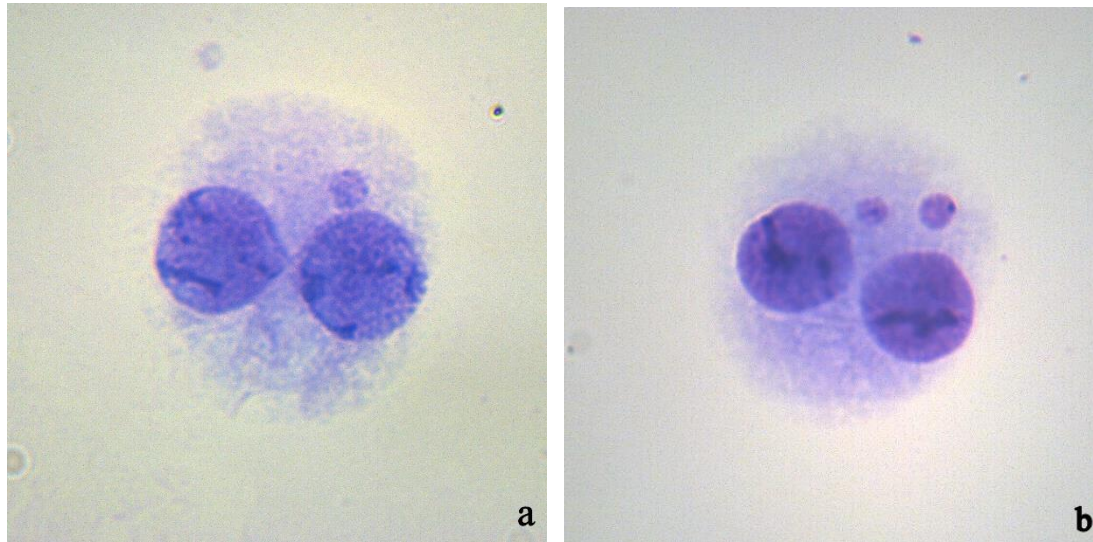
EPS_{KC27L}’nin tüm konsantrasyonlarında yalnızca bir mikronükleus içeren binükleat hücrelere rastlanılmıştır. EPS_{KC27L} mikronükleus frekanslarında ve nükleer bölünme indeksinde (NBİ) ufak değişimlere neden olmuştur. Ancak bu değişimler kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemsizdir (Çizelge 4.3, Şekil 4.5, Resim 4.3).

Çizelge 4.3. EPS_{KC27L}’nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları ile nükleer bölünme indeksi (NBİ)

Uygulama grubu	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları (1)	MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)				
Kontrol	48	0,00	2000	5	0,25 ± 0,11	2,15 ± 0,46
MMC	48	0,20	2000	22	1,10 ± 0,23	1,80 ± 0,42
EPS _{KC27L}	48	12,50	2000	4	0,20 ± 0,10	2,00 ± 0,44
		25,00	2000	5	0,25 ± 0,11	1,99 ± 0,44
		50,00	2000	7	0,35 ± 0,13	1,12 ± 0,33
		100,00	2000	7	0,35 ± 0,13	2,02 ± 0,44



Şekil 4.5. EPS_{KC27L}'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları



Resim 4.3. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarında insan periferel lenfositlerinde gözlenen mikronükleus içeren binükleat hücrelerden örnekler: a) bir mikronükleuslu binükleat hücre, b) iki mikronükleuslu binükleat hücre

4.1.4. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkisi

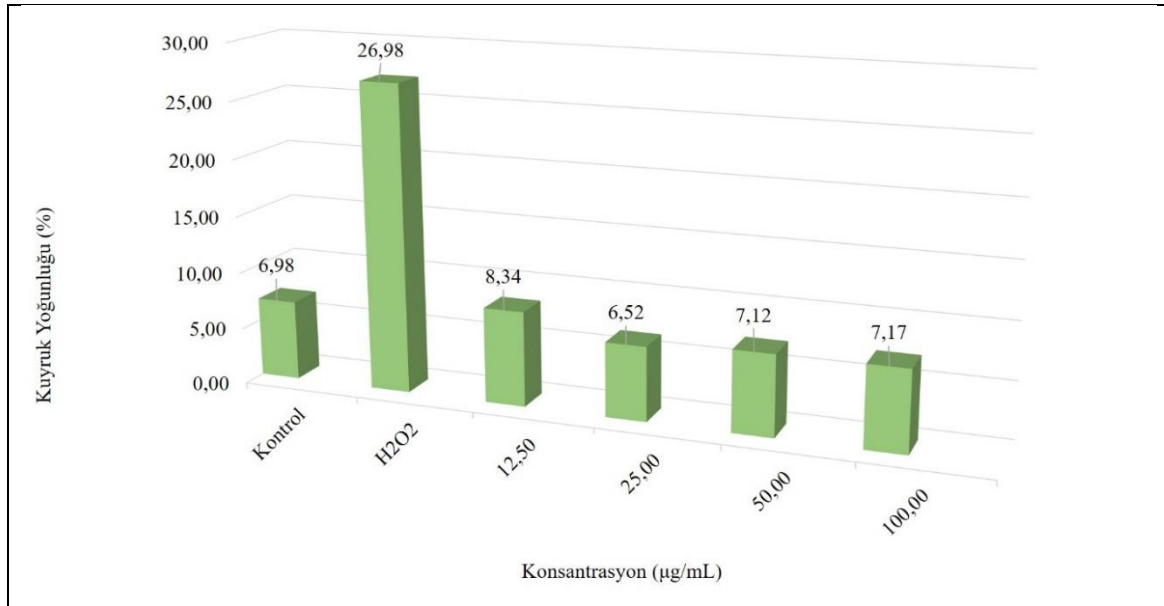
EPS_{KC27L}'nin izole insan lenfositlerinde 1 saatlik uygulamasının DNA hasarı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla comet testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından incelenmiş ve

Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Resim 4.4'te comet testinde incelenen DNA hasar örnekleri gösterilmiştir.

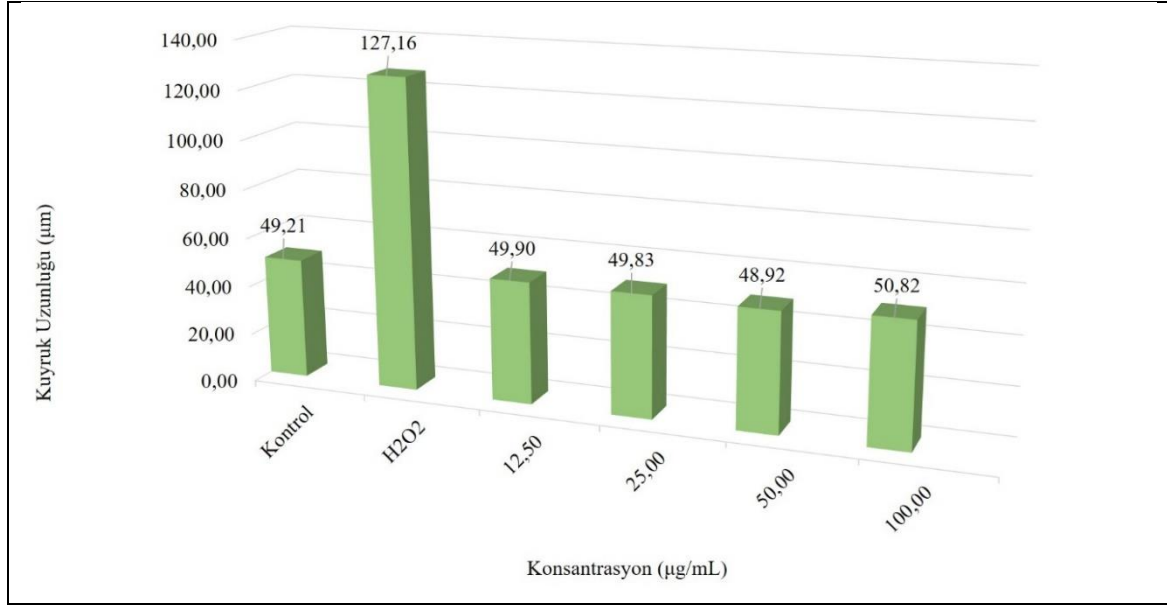
Değerlendirilen kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde EPS_{KC27L}'nin hiçbir konsantrasyonu kontrole göre anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Çizelge 4.4. EPS_{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ile kuyruk momenti üzerine etkileri

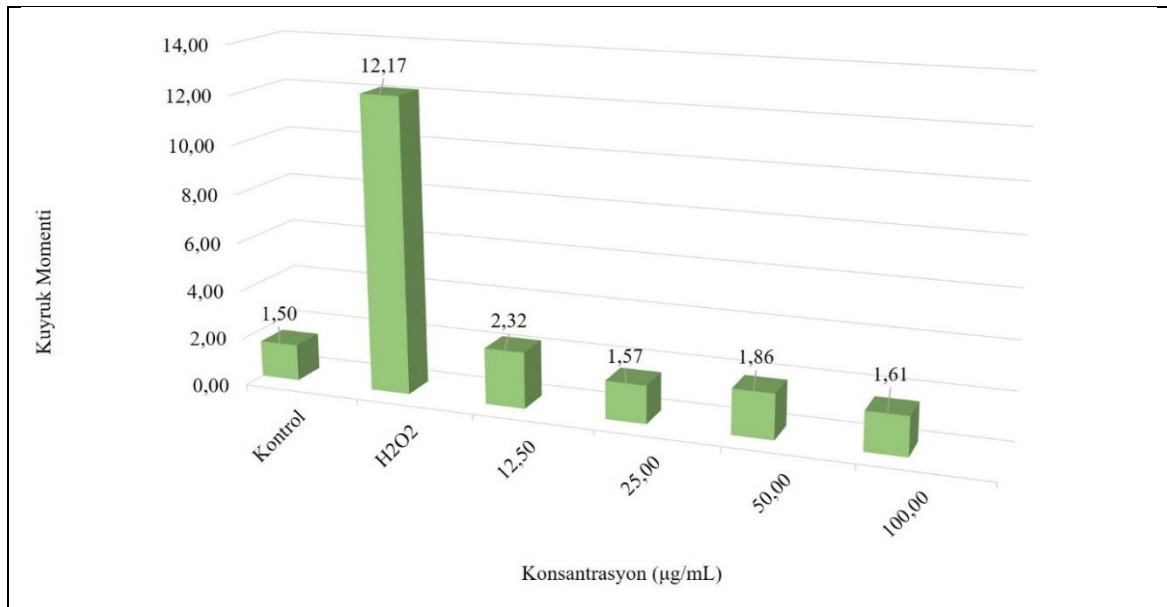
Uygulama grubu	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
Kontrol	1	0,00	6,98 ± 0,70	49,21 ± 1,19	1,50 ± 0,16
H ₂ O ₂	1	100 µM	26,98 ± 1,80	127,16 ± 4,31	12,17 ± 1,01
EPS _{KC27L}	1	12,50	8,34 ± 1,11	49,90 ± 1,27	2,32 ± 0,47
		25,00	6,52 ± 0,90	49,83 ± 1,02	1,57 ± 0,28
		50,00	7,12 ± 1,02	48,92 ± 0,98	1,86 ± 0,41
		100,00	7,17 ± 0,90	50,82 ± 1,07	1,61 ± 0,26



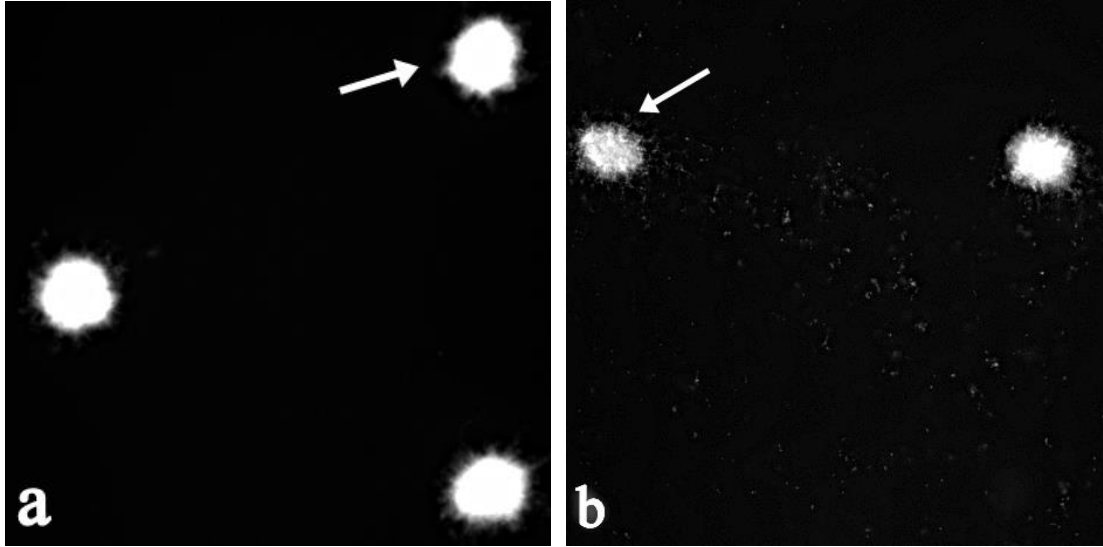
Şekil 4.6. EPS_{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



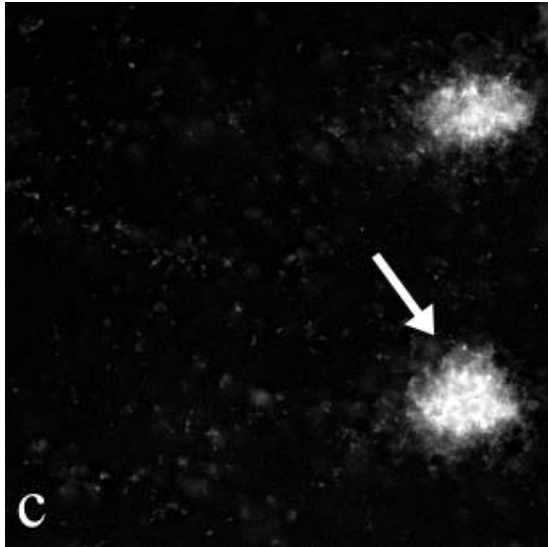
Şekil 4.7. EPS_{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.8. EPS_{KC27L} uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk momenti üzerine etkileri



Resim 4.4. EPS_{KC27L} ve $EPS_{KC27L} + H_2O_2$ uygulamalarında izole insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarlarından örnekler: a) hasarsız DNA b) orta hasarlı DNA c) çok hasarlı DNA



Resim 4.4. EPS_{KC27L} ve $EPS_{KC27L} + H_2O_2$ uygulamalarında izole insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarlarından örnekler: a) hasarsız DNA b) orta hasarlı DNA c) çok hasarlı DNA

4.2. EPS_{KC27L}'nin Mitomisin-C (MMC) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.2.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

EPS_{KC27L}'nin MMC ile birlikte 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdıkları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

EPS_{KC27L}'nin MMC ile birlikte eş zamanlı 24 ve 48 saatlik süreler ile uygulanması sonucunda yedi tip yapısal, iki tip sayısal anormallik gözlenmiştir. Yapısal anormallikler görülme sıklıklarına göre kromatid kırığı (%51,66), fragment (%18,49), kromozom kırığı (%10,90), kromatid değişimi (%7,11), kardeş kromatidlerde birleşme (%5,21), disentrik kromozom (%3,32) ve halka kromozom (%0,47) dur. Gözlenen sayısal anormallikler ise poliploidi (%2,37) ve endoreduplikasyon (%0,47) dur. Halka kromozom ve endoreduplikasyona yalnızca 50 µg/mL konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasında rastlanmıştır (Çizelge 4.5, Resim 4.1).

EPS_{KC27L} her iki uygulama süresinde de MMC'nin neden olduğu anormal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını pozitif kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaltmıştır (Çizelge 4.5., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.). 48 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdelerinde azalmalar konsantrasyona bağlı değildir ($r=-0,43$). Öte yandan diğer tüm uygulamalarda bu durum konsantrasyonlar ile zayıf ve negatif yönlü korelasyonla gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada anormal hücre yüzdeleri için $r=-0,62$; 24 saatlik uygulamada hücre başına düşen anormallik frekansı için $r=-0,63$ ve 48 saatlik uygulamada hücre başına düşen anormallik frekansı için $r=-0,51$).

Çizelge 4.5. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları

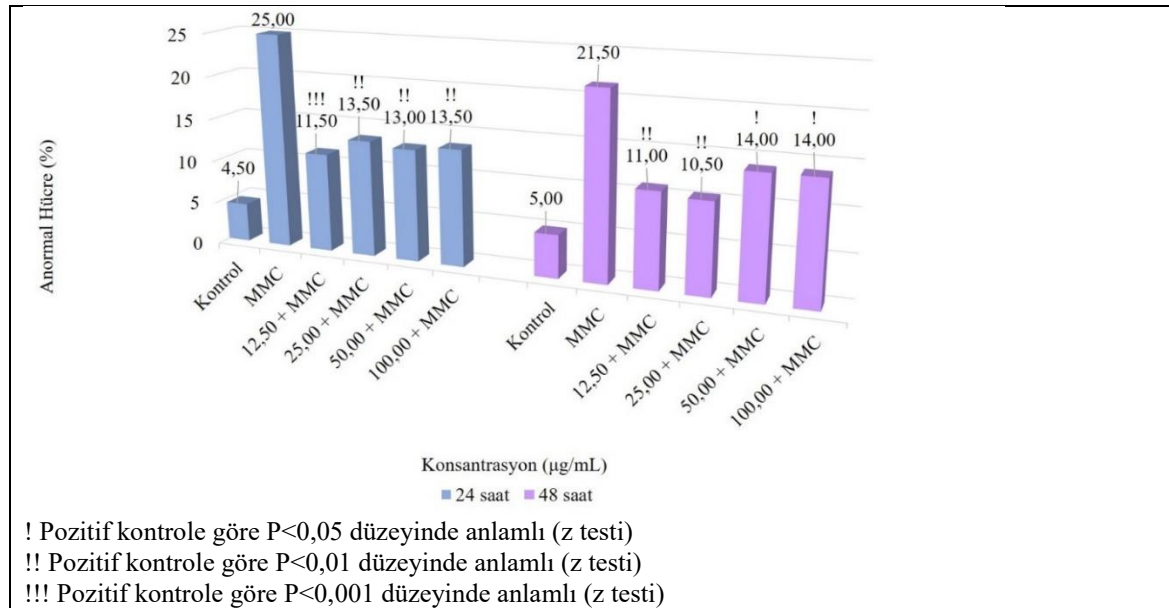
Uygulama grubu	Uygulama		Anormallikler									Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal						Sayısal				
			ktk	kzk	f	kkb	ktđ	ds	h	p	er		
Kontrol	24	0,00	5	3	-	-	-	-	-	1	-	4,50 ± 1,47	0,05 ± 0,02
MMC	24	0,20	31	7	11	3	2	-	-	1	-	25,00 ± 3,06	0,28 ± 0,03
EPS _{KC27L} + MMC	24	12,50	13	4	5	1	2	-	-	-	-	11,50 ± 2,26 !!!	0,13 ± 0,02 !!!
		25,00	15	3	5	1	1	1	-	1	-	13,50 ± 2,42 !!	0,14 ± 0,02 !!!
		50,00	13	2	6	3	1	-	1	1	1	13,00 ± 2,38 !!	0,14 ± 0,02 !!!
		100,00	18	2	4	2	1	1	-	1	-	13,50 ± 2,42 !!	0,15 ± 0,03 !!
Kontrol	48	0,00	5	1	1	-	-	-	1	2	-	5,00 ± 1,54	0,05 ± 0,02
MMC	48	0,20	27	6	9	2	1	2	-	2	-	21,50 ± 2,90	0,25 ± 0,03
EPS _{KC27L} + MMC	48	12,50	10	1	5	1	2	3	-	1	-	11,00 ± 2,21 !!	0,12 ± 0,02 !!!
		25,00	11	3	4	-	2	1	-	-	-	10,50 ± 2,17 !!	0,11 ± 0,02 !!!
		50,00	14	4	6	1	3	-	-	-	-	14,00 ± 2,45 !	0,14 ± 0,02 !!
		100,00	15	4	4	2	3	1	-	1	-	14,00 ± 2,45 !	0,15 ± 0,03 !
Kromozomal anormallik yüzdesi			51,66	10,90	18,49	5,21	7,11	3,32	0,47	2,37	0,47		

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

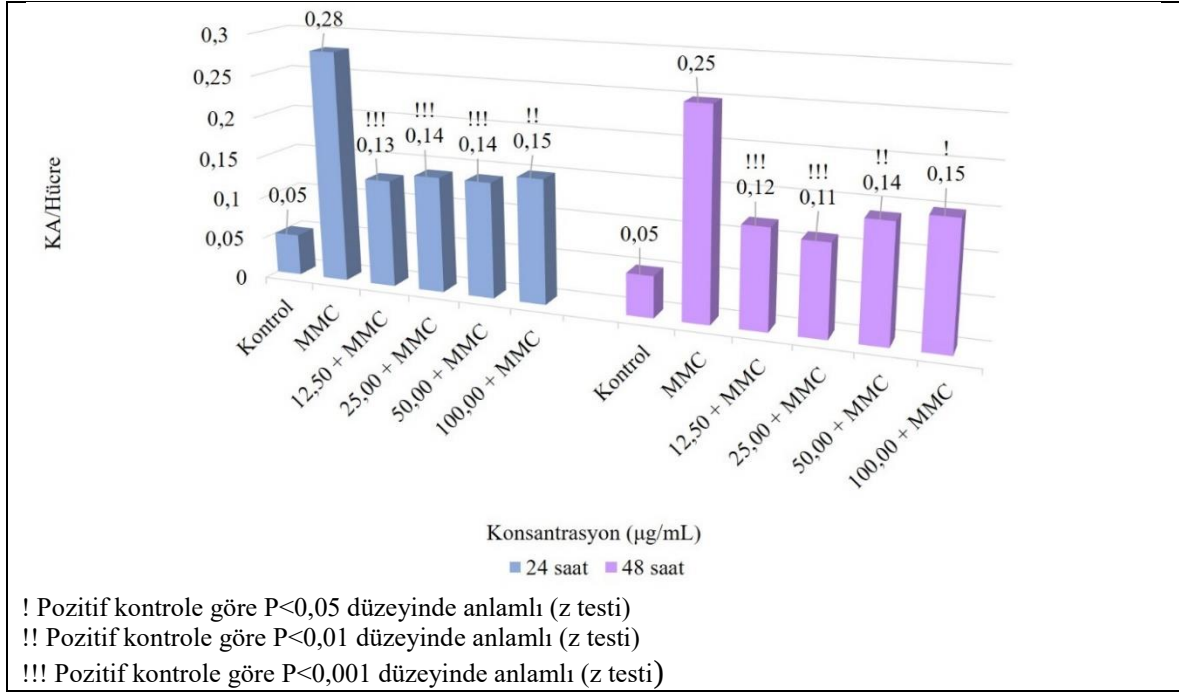
! Pozitif kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

!! Pozitif kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

!!! Pozitif kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri



Şekil 4.10. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları

4.2.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi

EPS_{KC27L}'nin MMC ile eş zamanlı 24 ve 48 saatlik uygulamalarının minimum-maksimum kardeş kromatid değişimleri, kardeş kromatid değişimi (KKD), birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitozunu gerçekleştiren hücreler, replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) üzerine etkileri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

EPS_{KC27L}'nin MMC ile eş zamanlı uygulanması iki uygulama süresinde 5-42 arası KKD oluşumuna neden olmuştur. Tüm EPS_{KC27L} konsantrasyonları, MMC mutajeni tarafından oluşturulan KKD miktarını iki uygulama süresinde de istatistiksel açıdan anlamlı oranda ve konsantrasyona bağlı (48 saatlik uygulama hariç) olarak azaltmıştır (24 saatlik uygulama için $r=-0,61$ ve 48 saat uygulama için $r=-0,40$). Replikasyon indeksinde ise (Rİ) her iki uygulama süresinde ve tüm konsantrasyonlarda küçük ve pozitif kontrole göre istatistiksel açıdan anlamsız değişimlere neden olmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.11., Resim 4.2).

EPS_{KC27L}'nin tüm konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde MMC'nin neden olduğu mitotik indeks (Mİ) düşüşünü istatistiksel açıdan arttırmıştır (Şekil 4.12). Ancak bu

artışlar 24 saatlik uygulamada zayıf oranda konsantrasyona bağılıyken ($r=0,41$), 48 saatlik uygulamada konsantrasyondan bağımsız ($r=0,34$) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.6)

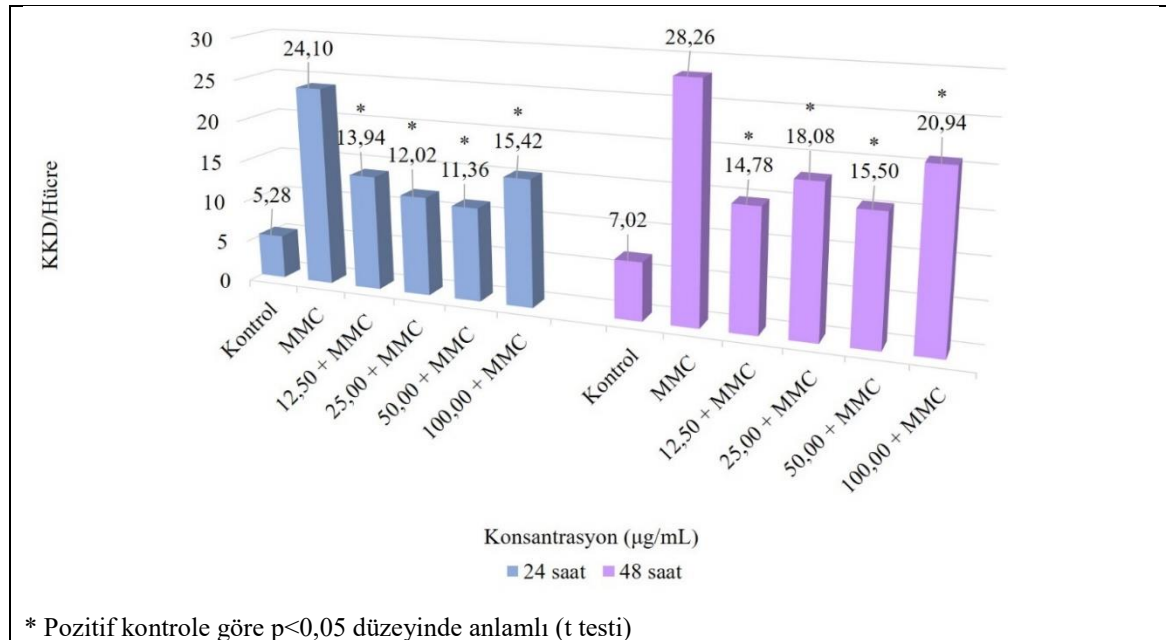
Çizelge 4.6. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri

Uygulama Grubu	Süre (saat)	Uygulama Konsantrasyon (µg/mL)	Min-Max KKD	KKD/Hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
Kontrol	24	0,00	0-14	5,28 ± 0,41	49	61	90	2,21 ± 0,06	6,55 ± 0,55
MMC	24	0,20	16-42	24,10 ± 0,89	95	56	49	1,77 ± 0,06	2,70 ± 0,36
EPS _{KC27L} + MMC	24	12,50	6-25	13,94 ± 0,80 *	75	63	62	1,94 ± 0,06	5,25 ± 0,50 !!!
		25,00	5-21	12,02 ± 0,52 *	58	68	74	2,08 ± 0,06	4,85 ± 0,48 !!!
		50,00	6-19	11,36 ± 0,49 *	70	78	52	1,91 ± 0,06	4,85 ± 0,48 !!!
		100,00	8-27	15,42 ± 0,55 *	77	71	52	1,88 ± 0,06	4,20 ± 0,45 !!
Kontrol	48	0,00	0-17	7,02 ± 0,47	56	54	90	2,17 ± 0,06	6,40 ± 0,55
MMC	48	0,20	14-54	28,26 ± 1,04	85	75	40	1,78 ± 0,05	2,70 ± 0,36
EPS _{KC27L} + MMC	48	12,50	9-31	14,78 ± 0,85 *	66	81	53	1,94 ± 0,05	5,30 ± 0,50 !!!
		25,00	9-41	18,08 ± 1,05 *	72	65	63	1,96 ± 0,06	5,15 ± 0,49 !!!
		50,00	6-29	15,50 ± 0,88 *	73	71	56	1,91 ± 0,06	4,25 ± 0,45 !!
		100,00	11-42	20,94 ± 1,00 *	82	78	40	1,79 ± 0,05	4,35 ± 0,46 !!

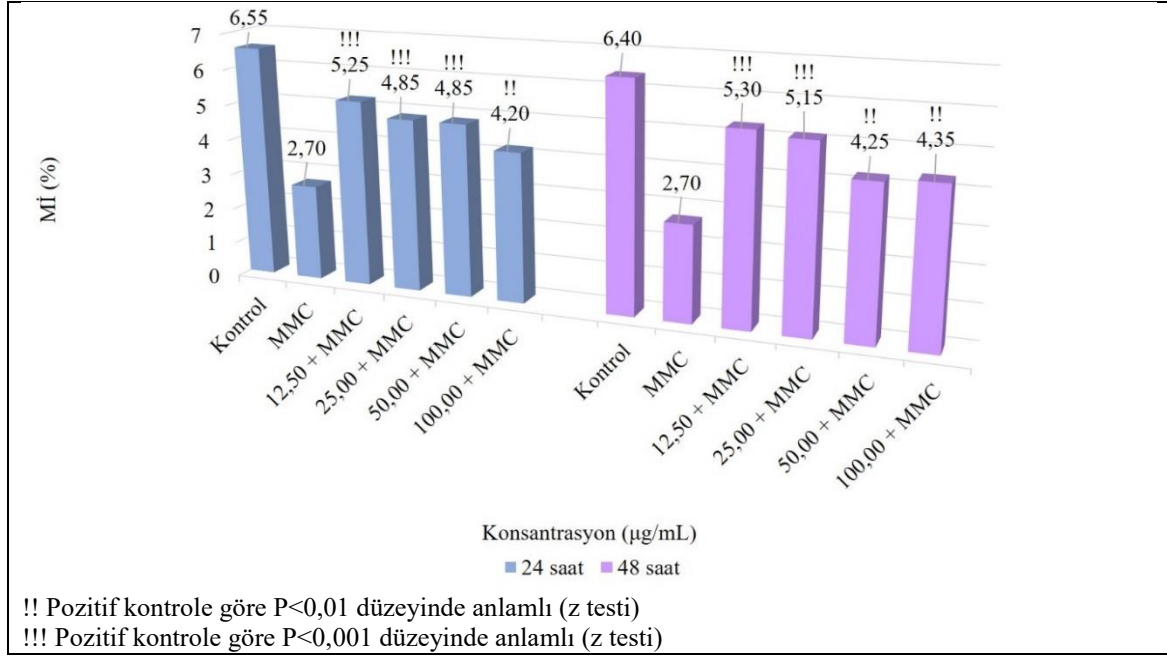
* Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

!! Pozitif kontrole göre $P<0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

!!! Pozitif kontrole göre $P<0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.11. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları



Şekil 4.12. EPS_{KC27L} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdıkları mitotik indeks (Mİ) değeri

4.2.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi

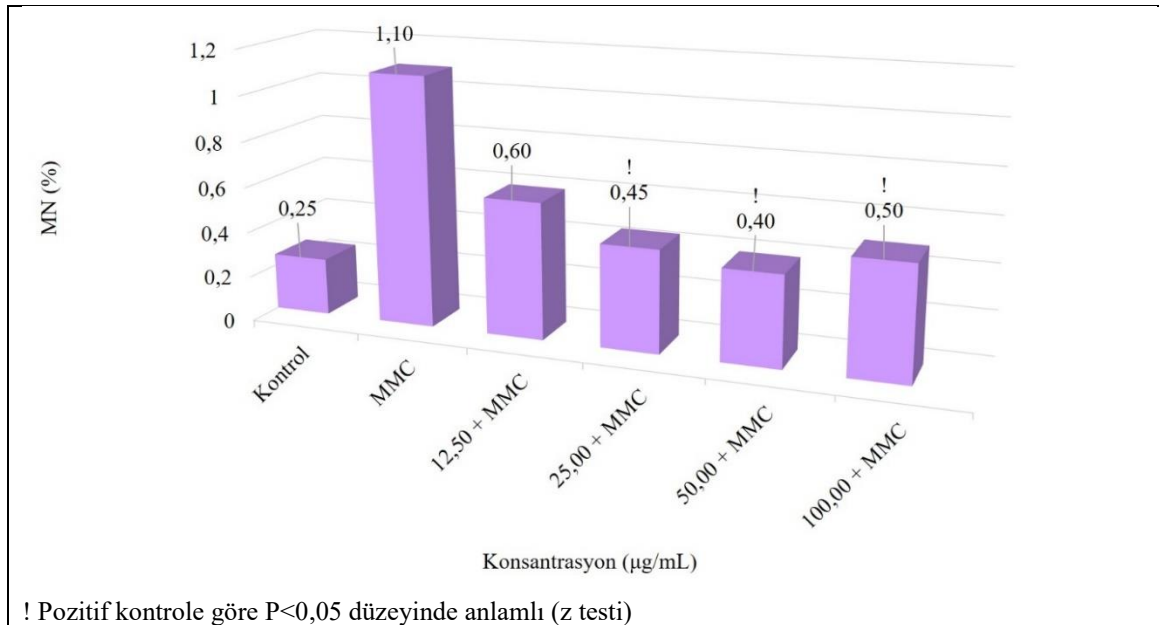
EPS_{KC27L} + MMC uygulamasından elde edilen binükleat hücrelerdeki mikronükleus oluşumu, mikronükleus frekansı (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

EPS_{KC27L}'nin, MMC'nin neden olduğu mikronükleus frekansı üzerine etkileri incelendiğinde pozitif kontrole kıyasla artan mikronükleus frekansını en düşük konsantrasyon (12,5 µg/mL) hariç tüm konsantrasyonlar istatistiksel anlamda ve konsantrasyona bağlı ($r = -0,78$) olarak azaltmıştır. Değerlendirilen binükleatlarda sadece bir mikronükleuslu hücrelere rastlanmıştır. Nükleer bölünme indeksinde (NBİ) ise pozitif kontrole göre artış söz konusu olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.7, Şekil 4.13, Resim 4.3).

Çizelge 4.7. EPS_{KC27L} + MMC'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) ile nükleer bölünme indeksi (NBİ) frekansları

Uygulama grubu	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları (1)	MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)				
Kontrol	48	0,00	2000	5	0,25 $\pm$ 0,11	2,15 $\pm$ 0,46
MMC	48	0,20	2000	22	1,10 $\pm$ 0,23	1,80 $\pm$ 0,42
EPS _{KC27L} + MMC	48	12,50	2000	12	0,60 $\pm$ 0,17	2,00 $\pm$ 0,44
		25,00	2000	9	0,45 $\pm$ 0,15	1,90 $\pm$ 0,43
		50,00	2000	8	0,40 $\pm$ 0,14	1,98 $\pm$ 0,44
		100,00	2000	10	0,50 $\pm$ 0,16	1,98 $\pm$ 0,44

! Pozitif kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.13. EPS_{KC27L} + MMC'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları

4.3. EPS_{KC27L}'nin Metil Metansülfonat (MMS) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.3.1. Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

EPS_{KC27L}'nin MMS ile birlikte 24 ve 48 saat kültür süreleriyle uygulanmasının insan periferik lenfositlerinde neden oldukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

EPS_{KC27L}'nin MMS ile birlikte eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelelerinin sonucunda beş tip yapısal ve bir tip sayısal anormallik gözlenmiştir. Gözlenen yapısal anormallikler görülme sıklıklarına göre kromatid kırığı (%41,98), fragment (%34,35), kromozom kırığı (%8,40), disentrik kromozom (%8,40) ve kardeş kromatidlerde birleşme (%5,34) dir. Kromatid değişimi sadece pozitif kontrol olan MMS'de görülmüştür. Sayısal anormallik ise poliploidi (%1,53) dir (Çizelge 4.8, Resim 4.1).

MMS ile birlikte eş zamanlı olarak 24 ve 48 saatlik kültür süresince uygulanan EPS_{KC27L} normal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını pozitif kontrole göre anlamlı düzeyde azaltmıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). 24 saatlik uygulamada her iki parametredeki azalmalar da zayıf oranda konsantrasyona bağlı iken (hücre başına düşen anormallik frekansı için $r=-0,55$ ve anormal hücre yüzdeleri için $r=-0,53$) 48 saatlik uygulamalarda bu değişimler konsantrasyonla güçlü korelasyonda (hücre başına düşen anormallik frekansı için $r=-0,78$ ve anormal hücre yüzdeleri için $r=-0,80$) gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.8. EPS_{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferik lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri ile hücre başına düşen anormallik frekansları

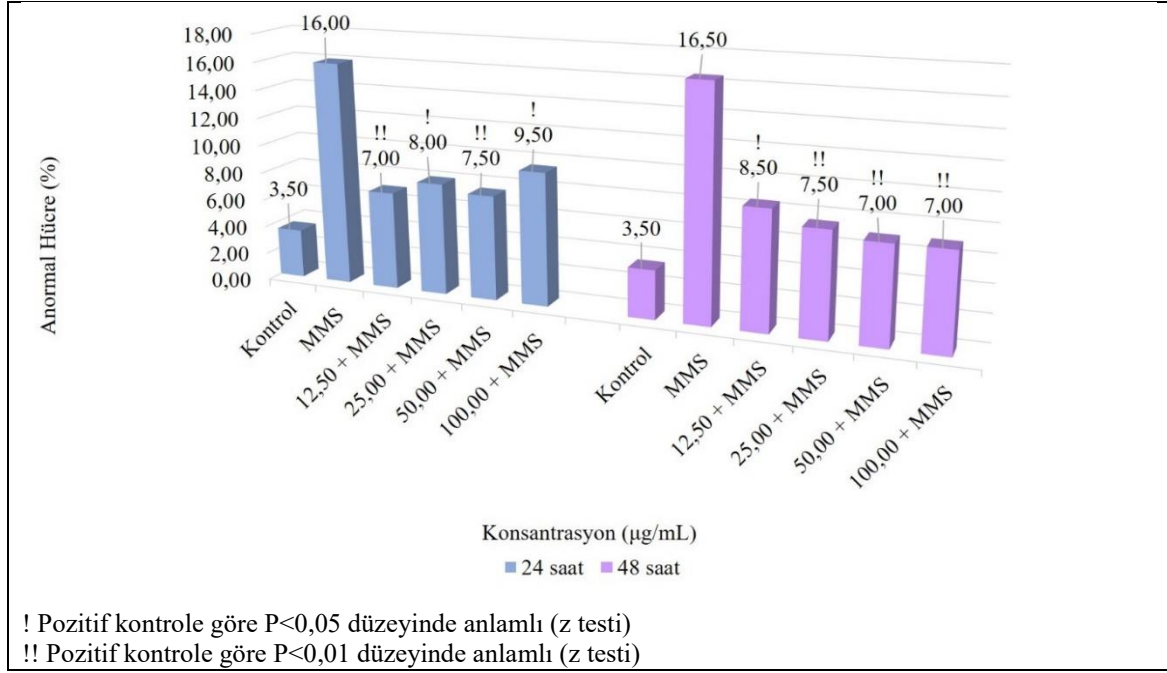
Uygulama grubu	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yapısal								
			ktk	kzk	f	kkb	ktd	ds	p		
Kontrol	24	0,00	2	-	4	-	-	-	1	3,50 ± 1,30	0,04 ± 0,01
MMS	24	5,00	15	5	13	1	1	1	1	16,00 ± 2,60	0,19 ± 0,03
EPS _{KC27L} + MMS	24	12,50	5	1	7	-	-	1	-	7,00 ± 1,80 !!	0,07 ± 0,02 !!!
		25,00	5	2	6	1	-	1	1	8,00 ± 1,92 !	0,08 ± 0,02 !!
		50,00	5	1	6	2	-	1	1	7,50 ± 1,86 !!	0,08 ± 0,02 !!
		100,00	8	3	5	1	-	2	-	9,50 ± 2,07 !	0,10 ± 0,02 !!
Kontrol	48	0,00	3	-	3	-	-	-	1	3,50 ± 1,30	0,04 ± 0,01
MMS	48	5,00	14	6	8	1	1	4	1	16,50 ± 2,62	0,18 ± 0,03
EPS _{KC27L} + MMS	48	12,50	9	1	4	1	-	3	-	8,50 ± 1,97 !	0,09 ± 0,02 !!
		25,00	9	1	6	-	-	1	-	7,50 ± 1,86 !!	0,09 ± 0,02 !!
		50,00	5	1	5	2	-	2	-	7,00 ± 1,80 !!	0,08 ± 0,02 !!
		100,00	9	1	6	-	-	-	-	7,00 ± 1,80 !!	0,08 ± 0,02 !!
Kromozoma l anormallik yüzdesi			41,98	8,40	34,35	5,34	0,00	8,40	1,53		

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

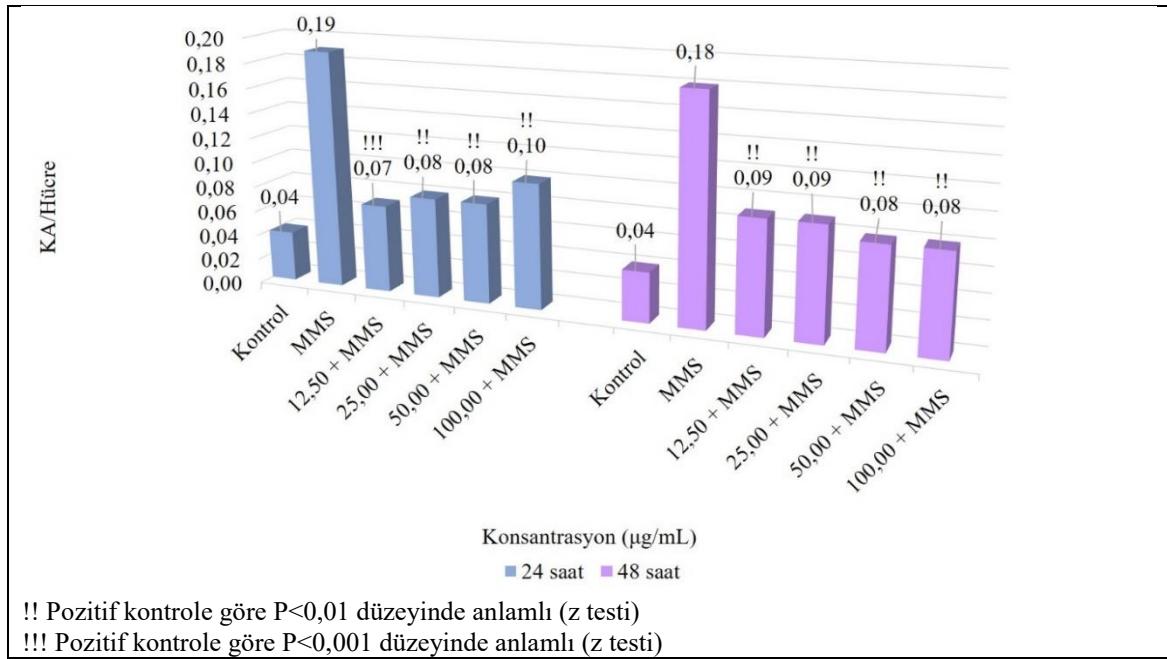
! Pozitif kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

!! Pozitif kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

!!! Pozitif kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.14. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri



Şekil 4.15. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına düşen anormallik frekansları

4.3.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ) üzerine etkisi

EPS_{KC27L}'nin MMS mutajeniyle birlikte eş zamanlı olarak 24 ve 48 saatlik uygulamalarının minimum-maksimum kardeş kromatid değişimleri, kardeş kromatid değişimi (KKD), birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) mitozunu gerçekleştiren hücreler, replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) üzerine etkileri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

MMS ile eş zamanlı uygulanan EPS_{KC27L}, 4-15 arası KKD oluşumuna neden olmuştur. EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik muamele süreleriyle uygulanan tüm konsantrasyonları, MMS'nin arttırdığı KKD miktarını istatistiksel açıdan anlamlı ve konsantrasyona bağlı olarak azaltmıştır (24 saatlik uygulamada $r=-0,54$ ve 48 saatlik uygulamada $r=-0,71$). 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde tüm konsantrasyonlarda replikasyon indeksinde (Rİ) küçük artışlar söz konusu olup bu artışların hiçbiri pozitif kontrole göre istatistiksel açıdan önemli değildir (Çizelge 4.9, Şekil 4.16, Resim 4.2).

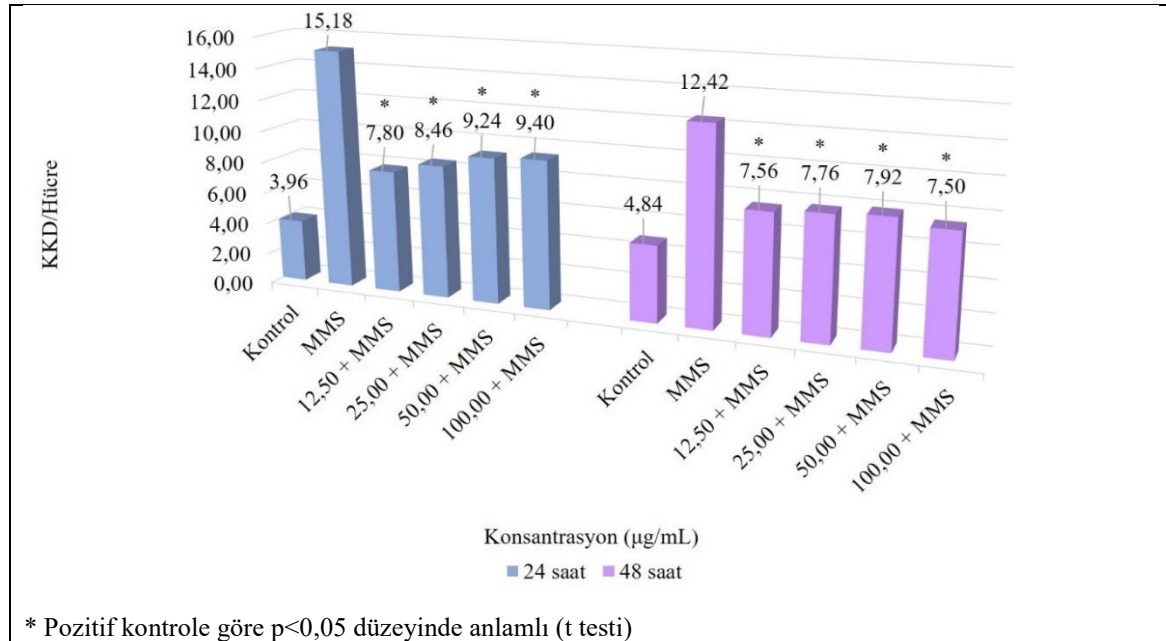
24 ve 48 saatlik kültür sürelerinde MMS ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanan EPS_{KC27L}'nin neden olduğu mitotik indeks (Mİ) değişimleri değerlendirilmiştir. EPS_{KC27L}, MMS'nin neden olduğu mitotik indeks düşüşünü anlamlı ve güçlü oranda konsantrasyona bağlı (24 saatlik uygulamada $r=0,71$ ve 48 saatlik uygulamada $r=0,70$) olarak arttırmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.17.).

Çizelge 4.9. EPS_{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdıkları kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi (Rİ) ile mitotik indeks (Mİ) değerleri

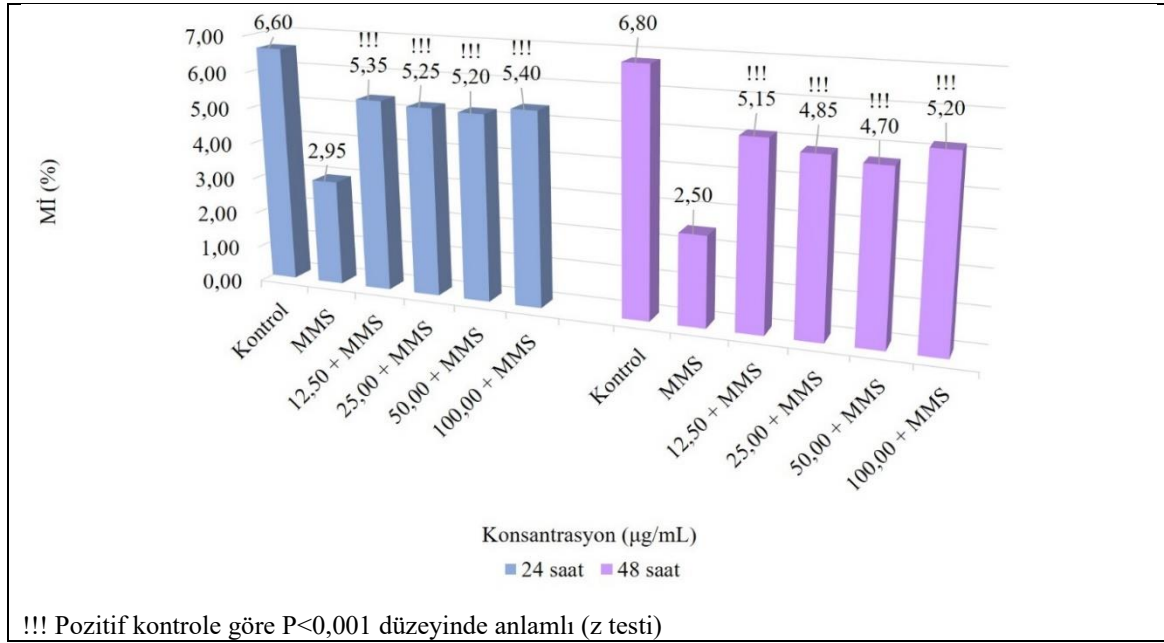
Uygulama Grubu	Süre (saat)	Uygulama Konsantrasyon (µg/mL)	Min-Max KKD	KKD/Hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH	Mİ ± SH
Kontrol	24	0,00	1-8	3,96 ± 0,22	59	68	73	2,07 ± 0,06	6,60 ± 0,56
MMS	24	5,00	9-24	15,18 ± 0,58	91	59	50	1,80 ± 0,06	2,95 ± 0,38
EPS _{KC27L} + MMS	24	12,50	4-14	7,80 ± 0,36 *	66	74	60	1,97 ± 0,06	5,35 ± 0,50 !!!
		25,00	4-14	8,46 ± 0,34 *	63	62	75	2,06 ± 0,08	5,25 ± 0,50 !!!
		50,00	4-15	9,24 ± 0,39 *	72	65	63	1,96 ± 0,08	5,20 ± 0,50 !!!
		100,00	5-15	9,40 ± 0,35 *	69	74	57	1,94 ± 0,06	5,40 ± 0,50 !!!
Kontrol	48	0,00	1-9	4,84 ± 0,26	56	63	81	2,13 ± 0,06	6,80 ± 0,56
MMS	48	5,00	8-19	12,42 ± 0,38	86	62	52	1,83 ± 0,06	2,50 ± 0,35
EPS _{KC27L} + MMS	48	12,50	4-14	7,56 ± 0,34 *	74	71	55	1,91 ± 0,06	5,15 ± 0,49 !!!
		25,00	4-15	7,76 ± 0,35 *	66	70	64	1,99 ± 0,06	4,85 ± 0,48 !!!
		50,00	4-14	7,92 ± 0,31 *	67	74	59	1,96 ± 0,06	4,70 ± 0,47 !!!
		100,00	4-12	7,50 ± 0,32 *	66	70	64	1,99 ± 0,06	5,20 ± 0,50 !!!

* Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

!!! Pozitif kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.16. EPS_{KC27L} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferall lenfositlerinde oluşturdıkları kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları



Şekil 4.17. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ + MMS'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferallenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri

4.3.3. Mikronükleus (MN) oluşumu ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkisi

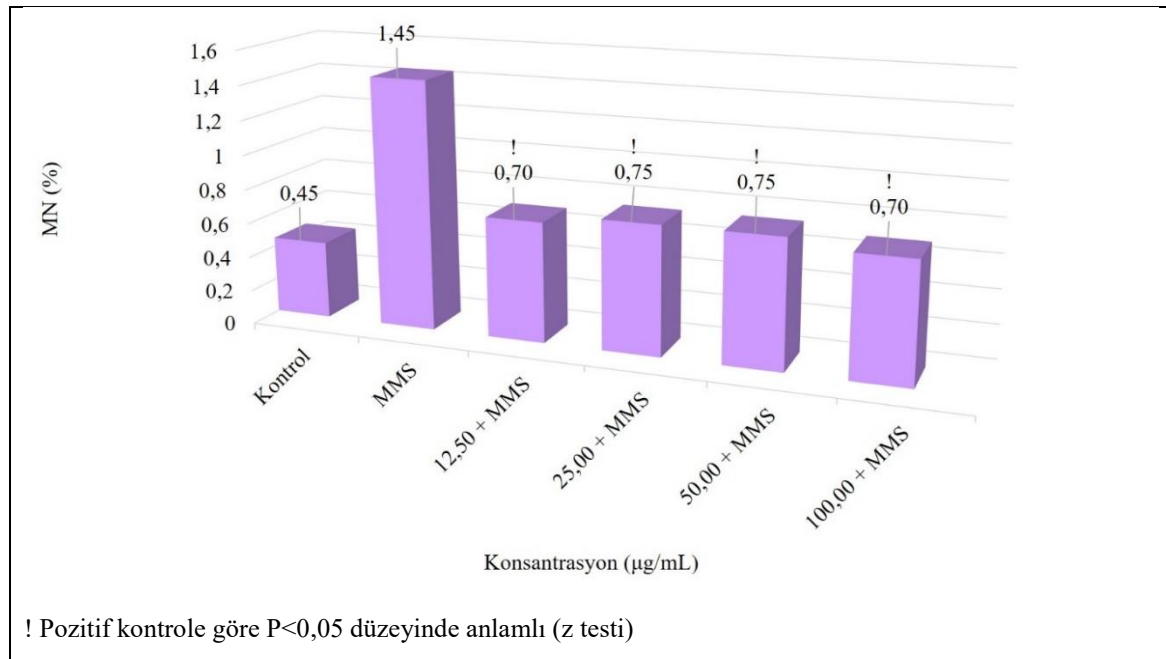
$\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin MMS ile eş zamanlı muamelesinden elde edilen mikronükleus içeren binükleatların frekansı ve mikronükleus (MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Sonuçlar pozitif kontrolle kıyaslandığında $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin tüm konsantrasyonlarında mikronükleus frekansında anlamlı bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu azalmanın regresyon analizi ile değerlendirilmesinde zayıf oranda konsantrasyona bağlı ($r = -0,71$) gerçekleştiği görülmüştür. Sadece bir ve iki mikronükleus içeren binükleat hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ + MMS uygulamasının nükleer bölünme indeksinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.10, Şekil 4.18, Resim 4.3).

Çizelge 4.10. EPS_{KC27L} + MMS'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) ile nükleer bölünme indeksi (NBI) frekansları

Uygulama grubu	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) $\pm$ SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (μ g/mL)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0,00	2000	9	-	0,45 $\pm$ 0,15	1,70 $\pm$ 0,41
MMS	48	5,00	2000	29	-	1,45 $\pm$ 0,27	1,59 $\pm$ 0,40
EPS _{KC27L} + MMS	48	12,50	2000	14	-	0,70 $\pm$ 0,19 !	1,54 $\pm$ 0,39
		25,00	2000	13	1	0,75 $\pm$ 0,19 !	1,43 $\pm$ 0,38
		50,00	2000	11	2	0,75 $\pm$ 0,19 !	1,52 $\pm$ 0,39
		100,00	2000	12	1	0,70 $\pm$ 0,19 !	1,55 $\pm$ 0,39

! Pozitif kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.18. EPS_{KC27L} + MMS'nin 48 saatlik uygulamalarının insan periferel lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus (MN) frekansları

EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarının tüm test sonuçları yüzde değişimleri ve anlamlılıklarıyla birlikte Çizelge 4.11'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarının kültüre alınmış insan periferel lenfositlerindeki yüzde değişimleri

		Anormal Hücre (%)	KA/Hücre	KKD/Hücre	Mİ (%)	MN (%)
EPS _{KC27L}						
24 saat	MMC	%455,56 ↑	%460,00 ↑	%356,44 ↑	%58,78 ↓	
	MMS	%357,14 ↑	%375,00 ↑	%283,33 ↑	%55,30 ↓	
	12,50 µg/mL	-	-	-	-	
	25,00 µg/mL	-	-	-	-	
	50,00 µg/mL	-	-	-	-	
	100,00 µg/mL	-	-	-	%29,00 ↓	
48 saat	MMC	%330,00 ↑	%400,00 ↑	%302,56 ↑	%57,81 ↓	%340,00 ↑
	MMS	%371,43 ↑	%350,00 ↑	%156,61 ↑	%63,24 ↓	%222,22 ↑
	12,50 µg/mL	-	-	-	-	-
	25,00 µg/mL	-	-	-	-	-
	50,00 µg/mL	-	-	-	-	-
	100,00 µg/mL	-	-	-	%26,56 ↓	-
EPS _{KC27L} + MMC						
24 saat	12,50 µg/mL	%54,00 ↓	%53,57 ↓	%42,16 ↓	%94,44 ↑	
	25,00 µg/mL	%46,00 ↓	%50,00 ↓	%50,12 ↓	%79,63 ↑	
	50,00 µg/mL	%48,00 ↓	%50,00 ↓	%52,86 ↓	%79,63 ↑	
	100,00 µg/mL	%46,00 ↓	%46,43 ↓	%56,29 ↓	%55,56 ↑	
48 saat	12,50 µg/mL	%48,84 ↓	%52,00 ↓	%47,70 ↓	%96,30 ↑	-
	25,00 µg/mL	%51,16 ↓	%56,00 ↓	%36,02 ↓	%90,74 ↑	%59,10 ↓
	50,00 µg/mL	%34,88 ↓	%44,00 ↓	%45,15 ↓	%57,41 ↑	%63,64 ↓
	100,00 µg/mL	%34,88 ↓	%40,00 ↓	%25,90 ↓	%64,11 ↑	%54,55 ↓
EPS _{KC27L} + MMS						
24 saat	12,50 µg/mL	%56,25 ↓	%63,16 ↓	%48,61 ↓	%81,36 ↑	
	25,00 µg/mL	%50,00 ↓	%57,89 ↓	%44,27 ↓	%77,97 ↑	
	50,00 µg/mL	%53,13 ↓	%57,89 ↓	%39,13 ↓	%76,27 ↑	
	100,00 µg/mL	%40,63 ↓	%63,16 ↓	%38,08 ↓	%83,05 ↑	
48 saat	12,50 µg/mL	%48,48 ↓	%50,00 ↓	%39,13 ↓	%106,00 ↑	%51,72 ↓
	25,00 µg/mL	%54,55 ↓	%50,00 ↓	%37,52 ↓	%94,00 ↑	%48,28 ↓
	50,00 µg/mL	%57,58 ↓	%55,56 ↓	%36,23 ↓	%88,00 ↑	%48,28 ↓
	100,00 µg/mL	%57,58 ↓	%55,56 ↓	%39,61 ↓	%108,00 ↑	%51,72 ↓

↑↓ Kontrolle göre anlamlı artış/azalış

↑↓ Pozitif kontrole göre anlamlı artış/azalış

4.4. EPS_{KC27L}'nin Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Tarafından Oluşturulan Hasarlara Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.4.1. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkisi

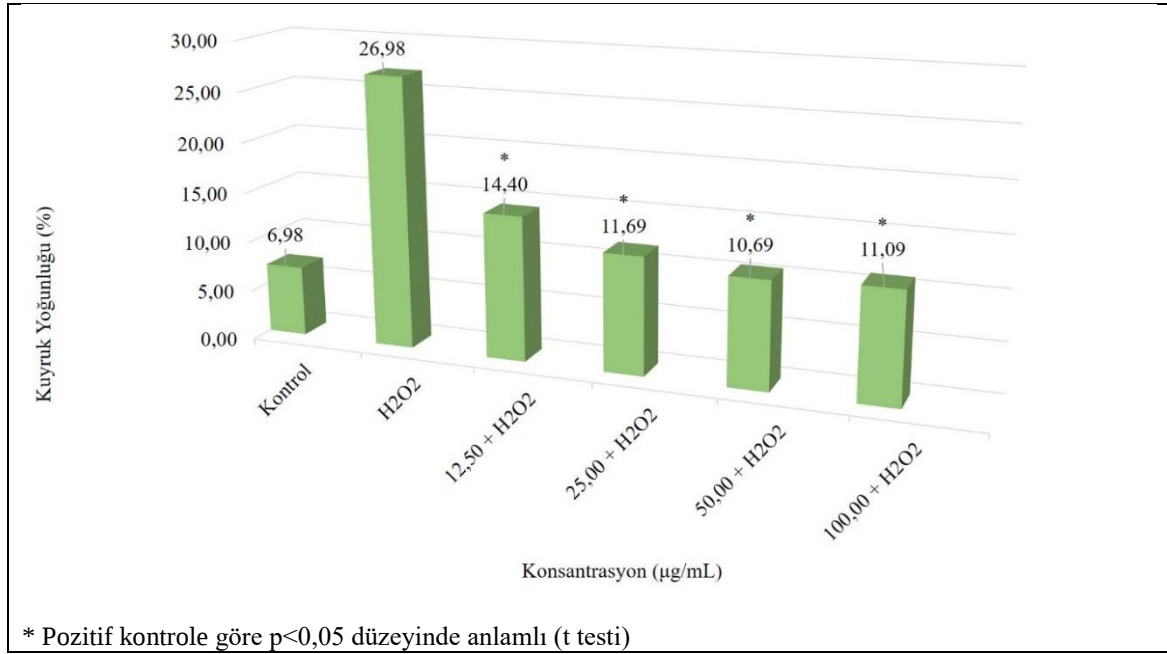
EPS_{KC27L}'nin H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı antigenotoksik etkileri izole insan lenfositlerinde comet testi ile incelenmiştir. Elde edilen veriler kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiş ve Çizelge 4.12'de verilmiştir.

EPS_{KC27L}'nin kuyruk yoğunluğu ($r=-0,82$), kuyruk uzunluğu ($r=-0,56$) ve kuyruk momentini ($r=-0,80$) pozitif kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı oranda ve konsantasyona bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21).

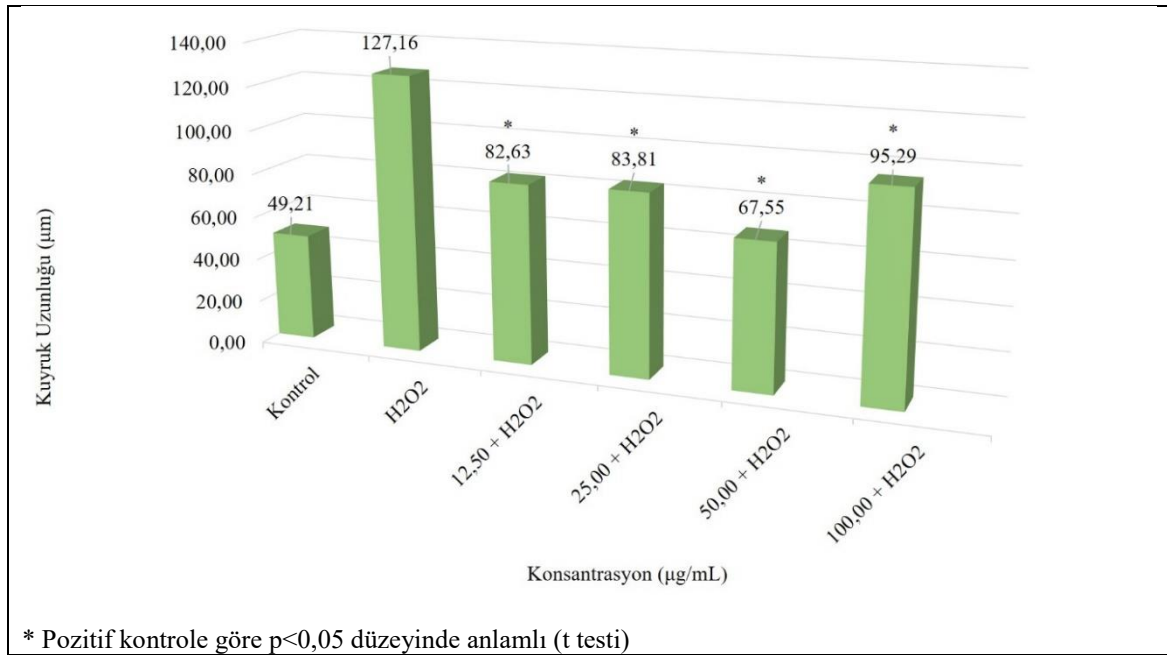
Çizelge 4.12. EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ile kuyruk momenti üzerine etkileri

Uygulama grubu	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
Kontrol	1	0,00	6,98 ± 0,70	49,21 ± 1,19	1,50 ± 0,16
H ₂ O ₂	1	100 µM	26,98 ± 1,80	127,16 ± 4,31	12,17 ± 1,01
EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂	1	12,50	14,40 ± 1,27 *	82,63 ± 3,63 *	5,68 ± 0,72 *
		25,00	11,69 ± 1,15 *	83,81 ± 3,79 *	4,22 ± 0,55 *
		50,00	10,69 ± 1,13 *	67,55 ± 2,90 *	3,61 ± 0,56 *
		100,00	11,09 ± 0,97 *	95,29 ± 4,45 *	4,27 ± 0,54 *

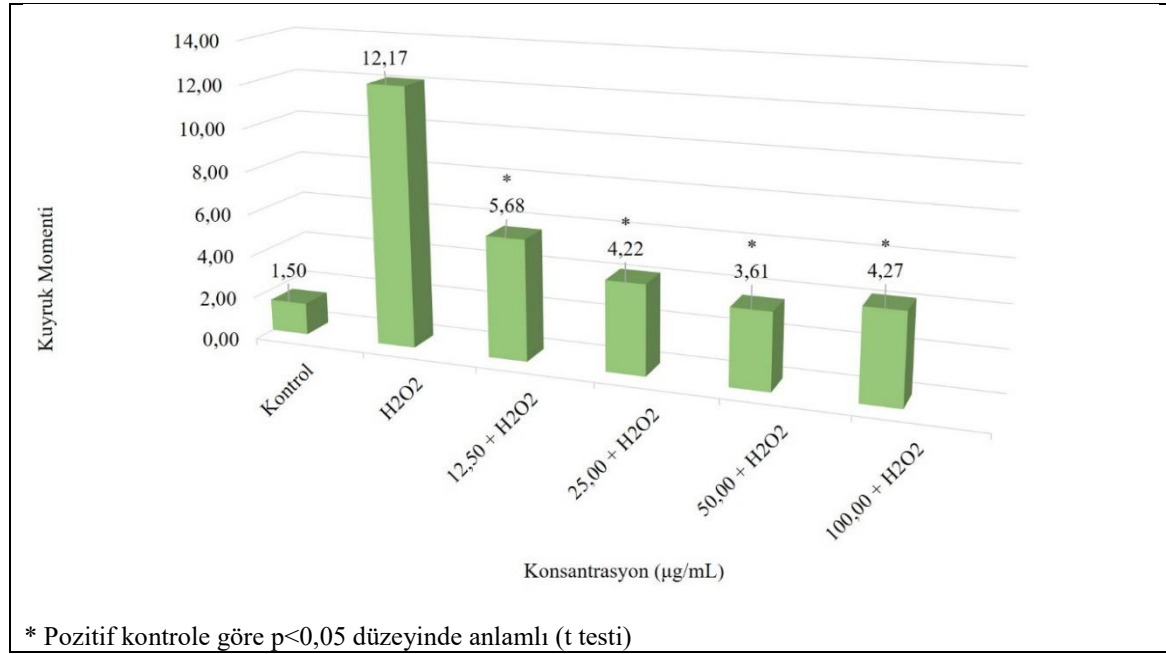
* Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.19. EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.20. EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.21. EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamasının izole insan lenfositlerindeki kuyruk momenti üzerine etkileri

EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamalarının comet test sonuçları yüzde değişimleri ve anlamlılıklarıyla birlikte Çizelge 4.13’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.13. EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + H₂O₂ uygulamalarının izole insan periferik lenfositlerindeki yüzde değişimleri

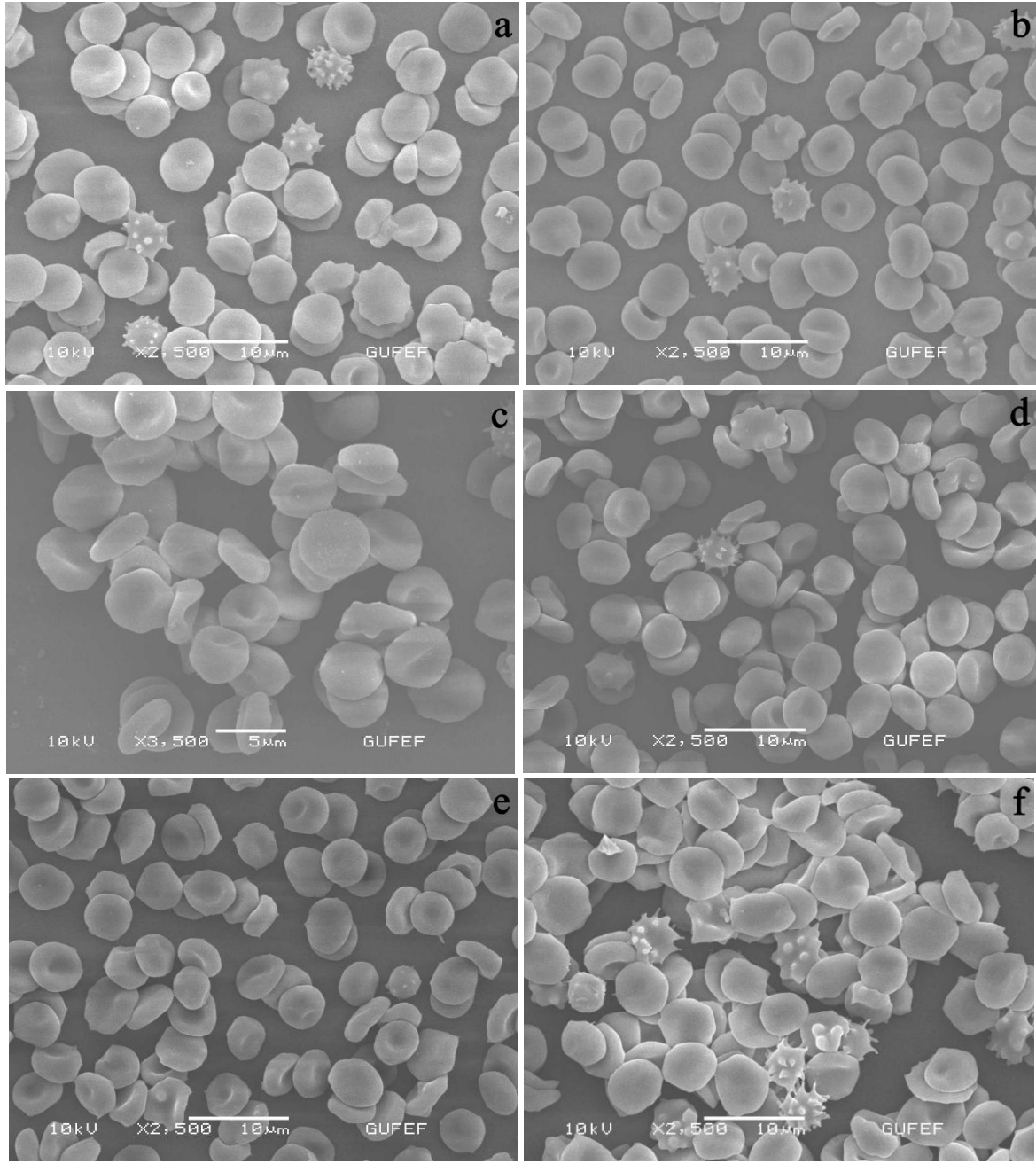
		Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk Momenti
EPS _{KC27L}				
1 saat	H ₂ O ₂	%286,53 ↑	%158,40 ↑	%711,33 ↑
	12,50 µg/mL	-	-	-
	25,00 µg/mL	-	-	-
	50,00 µg/mL	-	-	-
	100,00 µg/mL	-	-	-
EPS _{KC27L} + H ₂ O ₂				
1 saat	12,50 µg/mL	%46,63 ↓	%35,02 ↓	%53,33 ↓
	25,00 µg/mL	%56,67 ↓	%34,09 ↓	%65,32 ↓
	50,00 µg/mL	%60,38 ↓	%46,88 ↓	%70,34 ↓
	100,00 µg/mL	%58,90 ↓	%25,06 ↓	%64,91 ↓

↑↓ Kontrole göre anlamlı artış/azalış

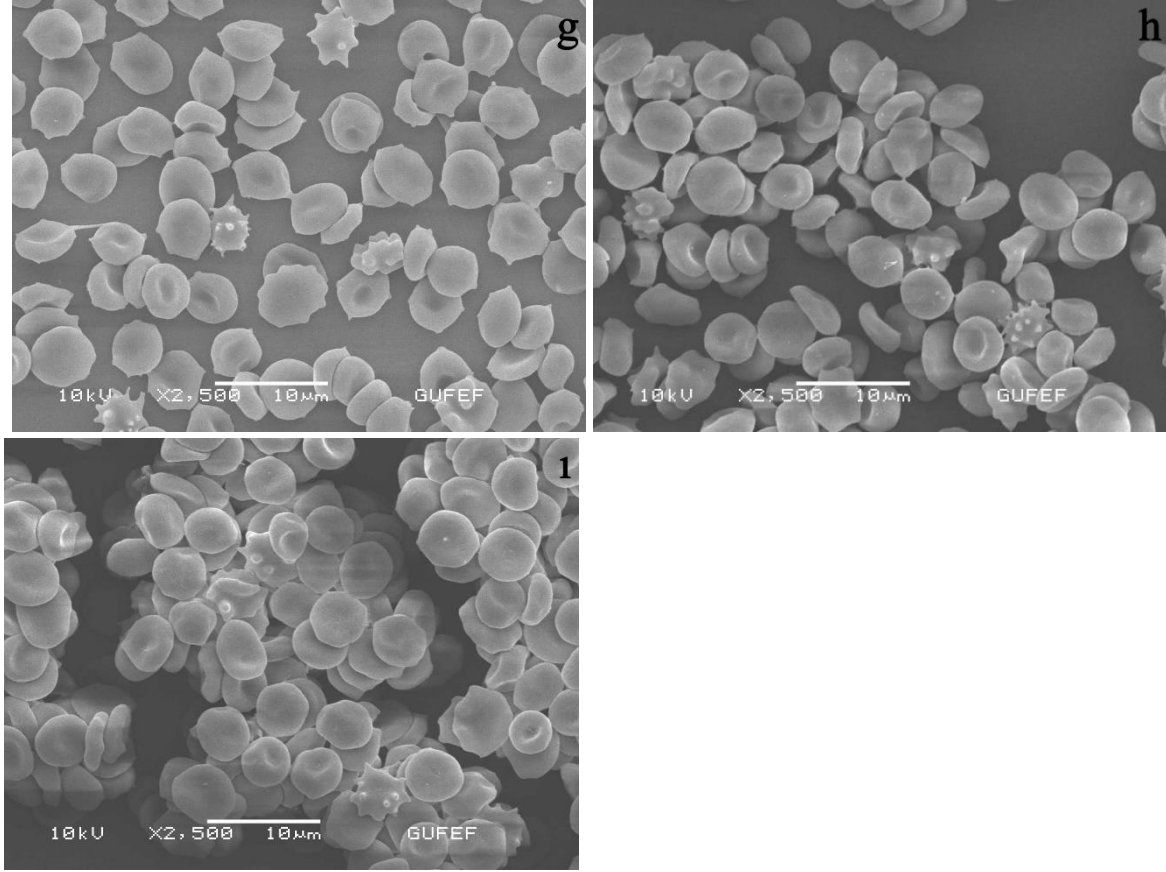
↑↓ Pozitif kontrole göre anlamlı artış/azalış

4.5. EPS_{KC27L}'nin Tek Başına ve Mitomisin-C (MMC) ile Birlikte Uygulamasının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

72 saatlik kültür sonlandırmasından sonra alınan EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamaları ile yapılan SEM analizinde seçilen bazı görüntüler Resim 4.5'te verilmiştir. Alınan numuneler, kültürler hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) eklenmesinden önce alındığı için lenfositlerin yanı sıra eritrositler de gözlenmiştir. EPS_{KC27L} ve MMC uygulamalarının lenfosit ve eritrositlerde belirgin değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.

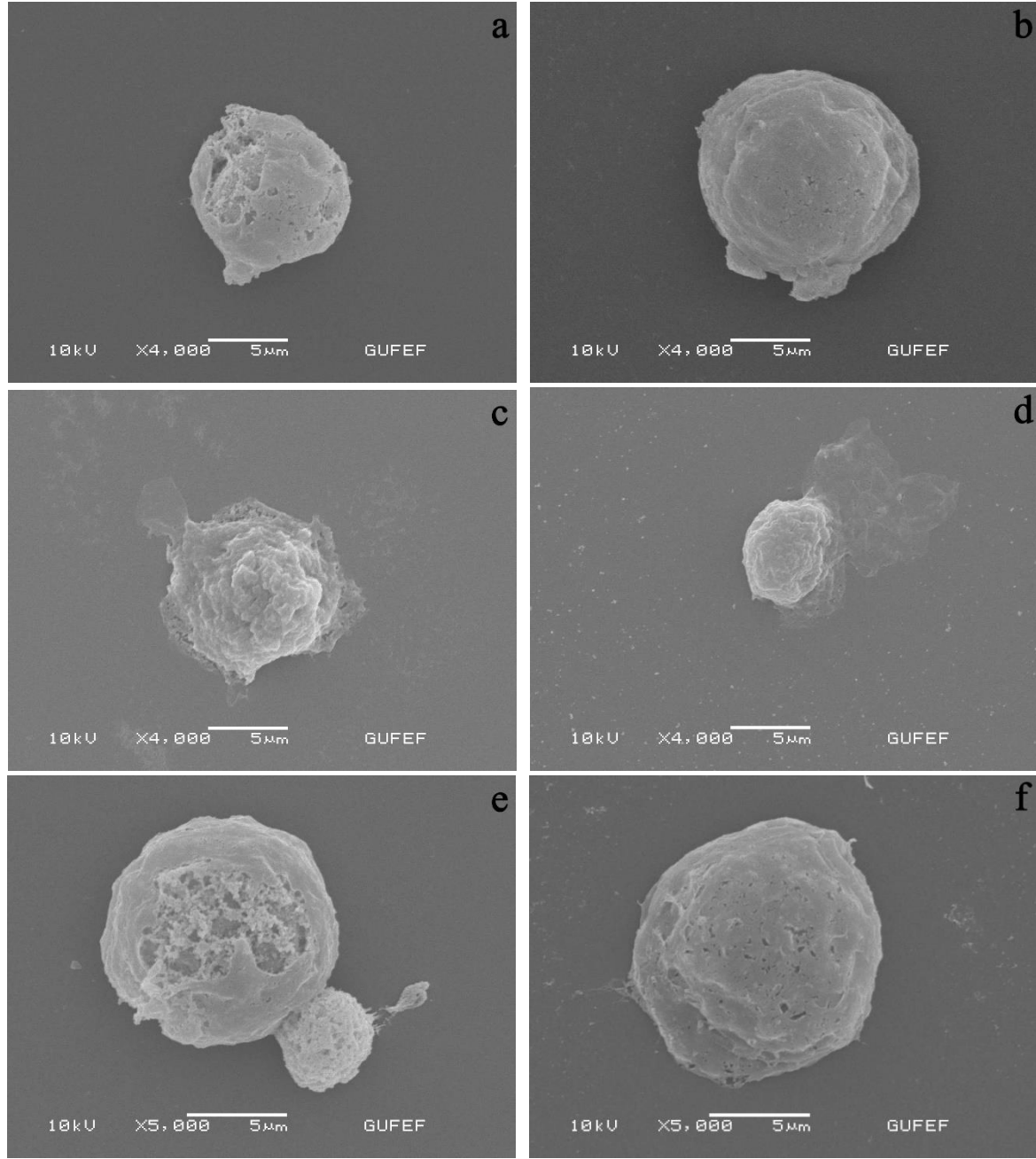


Resim 4.5. EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamalarından elde edilen eritrosit ve lenfositlerin SEM görüntüsü a) kontrol b) 12,50 µg/mL EPS_{KC27L} c) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} d) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} e) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} f) pozitif kontrol g) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC h) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC i) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC

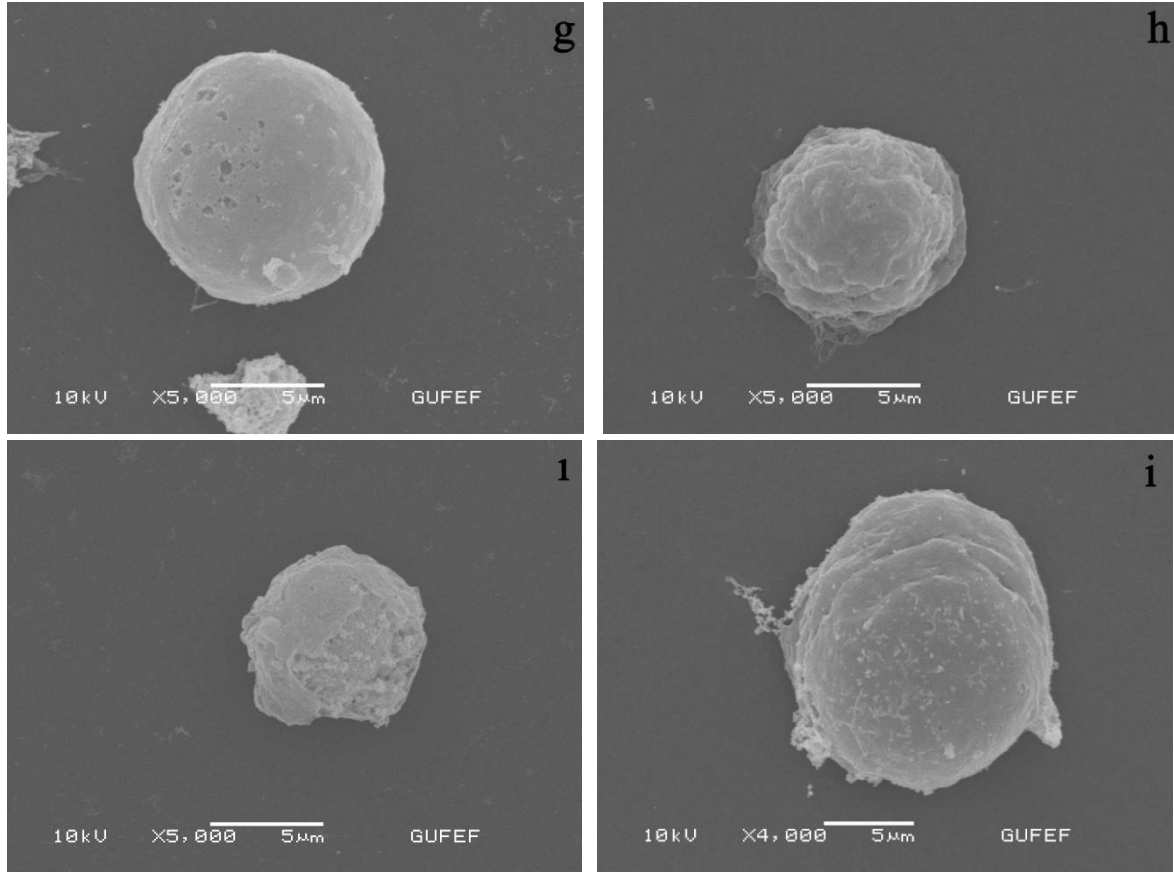


Resim 4.5. (devam) EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamalarından elde edilen eritrosit ve lenfositlerin SEM görüntüsü a) kontrol b) 12,50 µg/mL EPS_{KC27L} c) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} d) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} e) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} f) pozitif kontrol g) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC h) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC ı) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC

Fiksasyon işleminden sonra alınan EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamaları ile yapılan SEM analizinde seçilen bazı görüntüler ise Resim 4.6'da verilmiştir. Alınan numuneler son fiksasyon işleminden sonra yapılmıştır. Bu nedenle SEM analizinde lenfositler gözlenmiştir. EPS_{KC27L} ve MMC uygulamaları lenfositlerde belirgin değişikliğe neden olmamıştır.

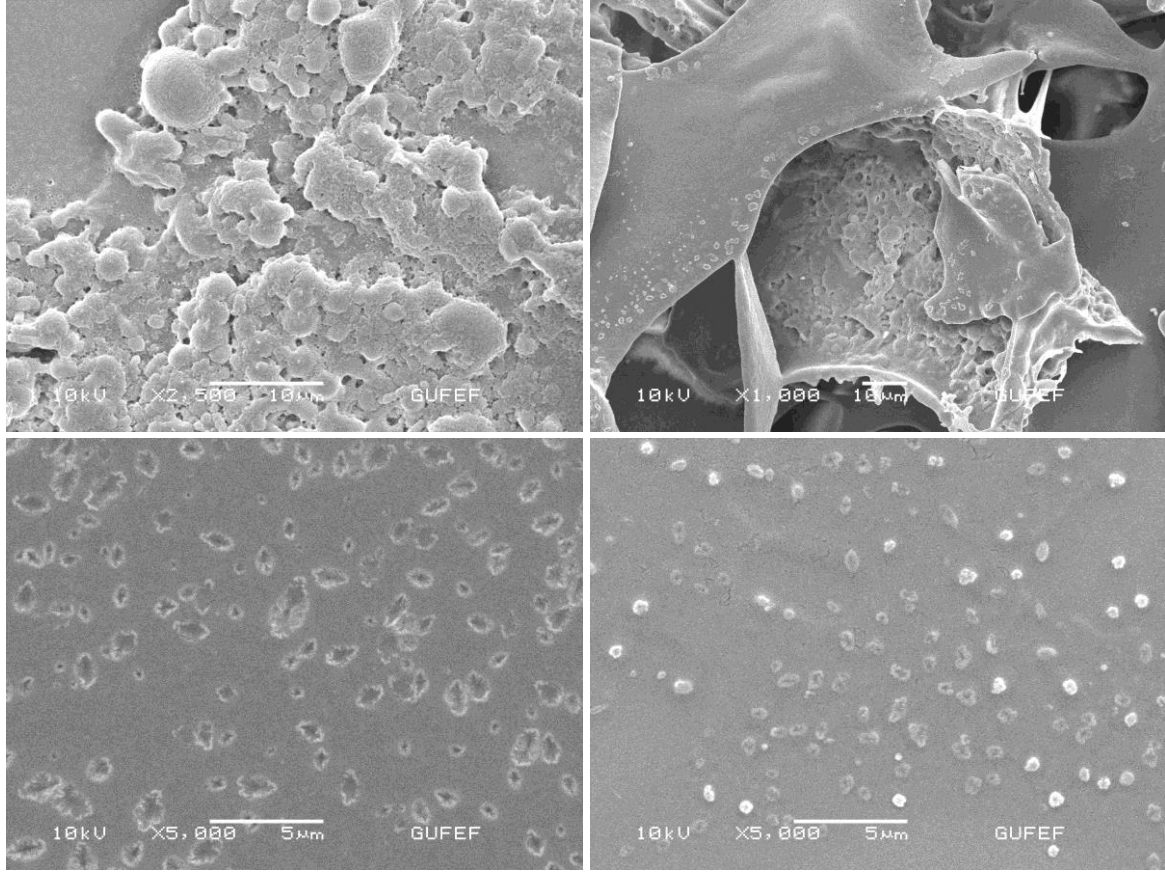


Resim 4.6. EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamalarından elde edilen lenfositlerin SEM görüntüsü a) kontrol b) 12,50 µg/mL EPS_{KC27L} c) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} d) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} e) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} f) pozitif kontrol g) 12,50 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC h) 25,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC i) 50,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC j) 100,00 µg/mL EPS_{KC27L} + MMC



Resim 4.6. (devam) $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ ve $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$ uygulamalarından elde edilen lenfositlerin SEM görüntüsü a) kontrol b) $12,50 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ c) $25,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ d) $50,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ e) $100,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ f) pozitif kontrol g) $12,50 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$ h) $25,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$ i) $50,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$ j) $100,00 \mu\text{g/mL}$ $\text{EPS}_{\text{KC27L}} + \text{MMC}$

$\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ iki fraksiyonlu bir yapıdır ve SEM analizinde bu yapılar gözlenmiştir. $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin iç yüzeyinin gözenekli ve kompakt mikroyapıda, dış yüzeyinin ise pürüzsüz yapıda olduğu gözlenmiştir (Resim 4.7).



Resim 4.7. EPS_{KC27L}'nin SEM görüntüleri

5. TARTIŞMA

Yiyecek ve içeceklerin hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde anahtar rolü giderek daha fazla kabul görmektedir. Fonksiyonel gıdaların üretimi ve tüketimi, temel beslenme fonksiyonlarının ötesinde sağlık yararı sağladığı için büyük önem kazanmıştır (Corbo ve diğerleri, 2014; John ve diğerleri, 2020; Granato ve diğerleri, 2020). Gastrointestinal sistemde bulunan mikroorganizmalar sağlığımız üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve bağırsak mikrobiyotasını modüle etmeyi hedefleyen beslenme stratejilerinin geliştirilmesi için önemlidir. Bu stratejiler arasında özellikle probiyotik ve prebiyotik substratların kullanımı yaygın bir yaklaşım oluşturmuştur (Salazar ve diğerleri, 2016). Bakterilerin, fonksiyonel gıdaların gelişimi ile ilgili olarak insan sağlığına yararlı etkileri, büyük ölçüde ekzopolisakkaritlerine atfedilmiştir (Nwodo ve diğerleri, 2012). Ayrıca oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını ve hastalıkları önlemede etkili olan antioksidanlar da fonksiyonel gıda olarak kullanılmaktadır (Lobo ve diğerleri, 2010).

Kendi başına bir alan olan EPS'lerin uygulanabilirliği neredeyse sınırsız olup çeşitli terapötik ve biyomedikal uygulamalar için güvenilir moleküller oldukları kanıtlanmıştır. Bu polimerlerin sağlıkla ilişkili yararlarının giderek daha fazla tanınması, daha az katkı maddesi içeren doğal ve sağlıklı ürünler için tüketici talebine uygun olan katma değerli fonksiyonel ürünlerin üretimini mümkün kılmaktadır (Shukla ve diğerleri, 2019; Andrew ve Jayaraman, 2020). Ayrıca polisakkaritler, normal hücreler üzerinde herhangi bir inhibitör etki yaratmadığından, gıda katkı maddesi olarak ve/veya diğer terapötik uygulamalarda kullanılacak gıda güvenliği önlemleri dikkate alındığında güvenli olarak kabul edilebilir (Dilna ve diğerleri, 2015). Mikrobiyal EPS'ler, diğer doğal kaynaklardan elde edilen polisakkaritlere kıyasla yeni ve farklı özellikleri nedeniyle birçok endüstri alanı için büyük bir potansiyele sahiptir. Bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlere kıyasla çok daha yüksek üretim titreleri ile elde edilebilirler (Moscovici, 2015; Yıldız ve Karataş, 2018).

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{KC27L}), antioksidan ve antibiyofilm aktiviteleri bulunmaktadır. Bu aktiviteleri ticari ve bitkisel kaynaklı bir prebiyotik olan inüline yakın orandadır veya inülinen daha etkilidir. EPS_{KC27L} antioksidan özelliğini, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve süperoksit anyon radikallerini (O^{2•-}) süpürücü etkisi ve demir iyonu (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi ile göstermektedir. Bu özelliği ile ticari olarak kullanılan prebiyotiklere alternatif olabileceği öngörülmüştür. EPS_{KC27L}'nin

antibiyofilm etkisi, onun biyofilm üreten bakterilerin büyümesini önlemek için antibiyofilm ajan olarak kullanılabileceğini ve inüline alternatif olarak tercih edilebileceğini göstermektedir. EPS'lerin glikoz ve mannoz şeker oranlarının yüksek olması, yem sanayisi ve eczacılık alanlarında kullanılma potansiyellerini arttırmaktadır. EPS_{KC27L}'nin şeker kompozisyonundaki glikoz, diğer şekerlere oranla daha yüksektir. Bu nedenle EPS_{KC27L}'nin bu alanlarda kullanılmasının avantajlı olacağı varsayılmıştır. İnülinin tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. EPS_{KC27L}'nin inüline yakın etkide veya daha etkili oranda antibiyofilm ve antioksidan aktivite sergilemesi, EPS_{KC27L}'nin yem katkı maddesi olarak kullanılmasının daha yararlı olacağını düşündürmektedir (Çelik, 2018).

Kimyasal mutajenez, mutajenlerin hücrelere alınması, reaktif metabolitlerin üretilmesi, DNA ile reaksiyon, DNA replikasyonu ve DNA onarımını içeren aşamalardan oluşmaktadır (Ohta, 1993). Mutajenlerin zararlı etkilerini en aza indirmenin en iyi yollarından biri doğal antimutajenlerin kullanılmasıdır. Antimutajenler, bir mutajenik bileşiğin, mutajene dönüşmesini önleyebilir, mutajeni etkisiz hale getirebilir veya mutajen ve DNA arasındaki reaksiyonu önleyebilir. DNA onarımı, rekombinasyonu ve replikasyon yollarının enzimlerini doğrudan veya dolaylı olarak uyarabilir, baskılayabilir veya etkisiz hale getirebilir. Bu maddelerin çoğu antimutajenik ve antikanserojenik özelliklerinin yanı sıra, antioksidan, immünomodülatör, hepatoprotektif, antihiperglisemik, kardiyoprotektif, antienflamatuar ve antiromatizmal gibi yararlı etkilere de sahiptir (Bhattacharya, 2011; AbdelHakem ve Abdelhafez, 2020).

Bir maddenin genotoksik etkilerinin tanımlanması, insan ve hayvan sağlığını korumayı amaçlayan uluslararası mevzuatlar bağlamında farmasötikler, nutrasötikler, pestisitler endüstriyel kimyasallar, kozmetik içerik maddeleri, veteriner ilaçları ve gıda katkı maddeleri gibi bileşiklerin onaylanması için belirleyici ve kritik bir adımdır. Ayrıca bileşiklerin, DNA hasarına neden olan toksik maddelere karşı olası koruyucu etkileri de belirlenebilmektedir (Corvi ve Madia, 2017; Mello ve diğerleri, 2017). Genotoksisite testleri, olası insan kanserojenlerinin ve mutajenlerinin belirlenmesi için DNA, gen ve kromozom hasarlarını tanımlayan *in vitro* ve *in vivo* yaklaşımlara dayanmaktadır (Turkez ve diğerleri, 2017). Tam bir genotoksisite değerlendirmesi, farklı mekanizmalarla genetik hasara neden olan bileşikleri tespit etmeyi amaçlayan *in vitro* ve *in vivo* testleri içermektedir (Guideline, 2011; Cartus ve Schrenk, 2017; Hartwig ve diğerleri, 2020). Bu testlerin, toksik maddelerin neden olduğu genotoksik aktiviteyi incelemek için kendi özellikleri ve sınırlamaları bulunmaktadır.

Bu nedenle genotoksik maddelerin belirlenmesi ve mekanizmalarının anlaşılması için tek bir test yeterli değildir (Turkez ve diğerleri, 2017; Sanz-Serrano ve diğerleri, 2020). Örneğin Kromozomal anormallik (KA) testi, anormal kromozomları, kromozom veya kromatid kırıklarını ve translokasyonlara neden olan toksik maddeleri tespit ederken MN testi sadece klastojenleri değil anöploidi indükleyen kimyasalları da belirlemektedir. Mikronükleus (MN) testi, hücre bölünmesinde ifade edilen kalıcı genetik hasarı tespit edebildiğinden, biyolojik numunenin toplanmasından önce meydana gelen kümülatif olayları da yansıtmaktadır. Ancak comet, biyolojik numunenin toplanmasından sonra, birkaç dakika veya saat sonra ortaya çıkabilecek geçici ve kısa ömürlü DNA hasarını da tespit edebildiğinden kısa süreli maruziyetin belirteci olarak kullanılabilir (Suspiro ve Prista, 2011). Böylece birbirini destekleyecek kanıtlar sunan genotoksisite testleri birlikte kullanılarak daha geçerli sonuçlara ulaşılabilmektedir.

Bir maddenin antigenotoksik ve antimutajenik etkisini yani maddenin DNA hasarını koruma yeteneğini belirleyebilmek için genetik materyale etkili bir şekilde zarar veren bir kimyasalın kullanılması gerekmektedir (Mello ve diğerleri, 2017). Alkilleyici ajanlar, DNA'nın nükleofilik merkezlerine saldırabilen elektrofilik bileşiklerdir. Sitotoksik ve mutajenik özelliklere sahip, doğrudan etkili DNA reaktif kimyasallardır. S-fazına bağlı klastojenik ajanlar olmakla birlikte maruz kalan hücrelerde DNA sentezi gerçekleşmedikçe kromozom anormallikleri oluşturmazlar. Tek fonksiyonlu (bir reaktif bölge içeren) ve çift fonksiyonlu (iki reaktif bölge içeren) ajanlar olarak sınıflandırılabilirler (Schwartz, 1989; Jenkins ve diğerleri, 2005). Tek fonksiyonlu alkilleyici ajanlar, DNA'daki tek bir bölgenin modifikasyonu için bir aktif kimyasal bölüm içerirler ve hedef molekül ile kovalent eklentiler oluştururlar. Organizmalarda hem kanserojen hem de mutajeniktirler (Beranek, 1990; Fu ve diğerleri, 2012; Puyo ve diğerleri, 2014). Esas olarak DNA zincirini kırıcı maddeler değildirler ve DNA omurgasının doğrudan kesilmesine neden olmazlar. Alkilasyon yoluyla baz modifikasyonu, N-glikozidik bağını zayıflatmakta, depürinasyon/depirimidinasyona ve alkali-kararsız abazik bölgelerin (AP bölgeleri) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. AP bölgelerinin çıkarılması, AP bölgelerine bitişik DNA'nın parçalanmasına yol açmaktadır (Horváthová ve diğerleri, 1998). Çift fonksiyonlu alkilleyici ajanlar ise DNA bazlarına bağlanabilen iki reaktif bölge içerirler. Karmaşık ve oldukça sitotoksik olan, replikasyon çatalını bloke eden DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağları oluşturabilirler. Dolayısıyla kemoterapötik ajanlar olarak kullanılabilirler (Jenkins ve diğerleri, 2005; Phillips ve Arlt, 2009; Kondo ve diğerleri, 2010; Gutierrez ve O'Connor,

2021). Çift fonksiyonlu alkilleyici ajanlar, tek işlevli alkilleyici ajanlara benzer özelliklere sahiptir, ancak sarmallar arası bağ oluşumuna sebep olan ve DNA bazları ile tepkimeye girebilen iki reaktif bölge içerirler. Mitomisin-C gibi çift fonksiyonlu aziridin bileşikler, çeşitli DNA eklerinin yanı sıra, G–G veya G–A çapraz bağları oluşturabilir (Fu ve diğerleri, 2012; Podarala ve diğerleri, 2020).

Mitomisin-C (MMC), kapsamlı olarak çalışılmış olan ve OECD tarafından genotoksisite çalışmalarında referans pozitif mutajen olarak önerilen bir genotoksik ajandır. MMC'nin metabolizması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve/veya tek ve çift fonksiyonlu alkilleyici türlerin oluşumuna yol açmaktadır. MMC, kinon içeren bir bileşiktir. Kinon kısmının bir veya iki elektronlu enzimatik indirgenmesi, sırasıyla bir yarı kinon veya bir hidrokinon ara ürünü üretimine neden olur. Bunların her ikisi de güçlü DNA alkile edici ajanlar olan serbest radikal ara ürünleridir. Aerobik koşullar altında yarıkinon ara ürünü, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) üreten ana bileşiğe oksitlenir. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur (Wang ve diğerleri, 2010; Klaunig ve diğerleri, 2011). MMC deneylerde mutagenezi indüklemek için alkilleyici ajan olarak uzun zamandır kullanılmaktadır (Khan, 2019). DNA hasarına yol açarak zincir kopmalarına, kromozom kırılmalarına, mikronükleus oluşumuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Lee ve diğerleri, 2007). Antioksidanlar, MMC'nin genotoksisitesine karşı etkili olabilmektedirler (Franke ve diğerleri, 2005b; Figat ve diğerleri, 2020; Sassi ve diğerleri, 2021).

Metil metansülfonat (MMS), tek işlevli, doğrudan etkili ve oldukça toksik bir alkilleyici ajandır. Temelde adenin ve guanin bazlarını metilleyerek genotoksik etki göstermektedir. MMS'nin bazlarla etkileşimi, abazik (AP) bir bölge oluşumuna ve DNA'da çapraz bağ oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum replikasyon çatalının engellenmesi ve DNA çift zincir kırıklarının oluşumu ile sonuçlanmaktadır. DNA çift kırıkları, DNA'da yapısal ve fonksiyonel özellikleri engelleyerek, replikasyon ve transkripsiyon dahil olmak üzere DNA metabolizmasında aksamalara sebep olmaktadır. Sonuçta kromozom hasarı, mikronükleus oluşumu ve hücre ölümü meydana gelmektedir. Bunların yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine neden olarak da genetik materyalde hasar vermektedir. MMS kaynaklı DNA hasarı, ağırlıklı olarak baz eksizyon onarımı (BER) ile tamir edilmektedir. MMS, genotoksik ajan olarak çeşitli genotoksisite testlerinde DNA hasarını indüklemek için uzun yıllardır tercih edilmektedir (Chang ve diğerleri, 2002; Lundin ve diğerleri, 2005;

Hosseinzadeh ve Sadeghnia,2007; Kitanovic ve diğerleri, 2009; Habas ve diğerleri, 2017; de Souza ve diğerleri, 2020).

Reaktif oksijen türleri (ROT) sitotoksik ve mutajenik hasarları indüklemektedir (Benhusein ve diğerleri, 2010). Yaşam için gerekli olan oksijenin, reaktif türleri aracılığıyla insan vücudu üzerinde zararlı etkilere neden olması ironiktir. Hücrelerin bu radikaller tarafından her gün ortalama 105 kez oksidatif strese indüklendiği tahmin edilmektedir (Carocho ve Ferreira, 2013). Hidrojen peroksit (H_2O_2) DNA ile herhangi bir kimyasal reaksiyona girmez. H_2O_2 kaynaklı DNA hasarı için iki olası açıklama önerilmiştir. Bunlardan ilki hem Fenton hem de Haber-Weiss reaksiyonları tarafından oldukça reaktif hidroksil radikallerinin ($OH\cdot$) üretimidir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülü geçiş metal iyonları (tipik olarak Fe^{2+}) varlığında (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) en güçlü radikal olan hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşür. İkinci açıklama hücre içinde nükleaz enzimlerinin aktivasyonuna yol açan bir dizi metabolik olayın tetiklenmesi ve DNA omurgasının apoptoza benzeyen bir mekanizmayla parçalanmasıdır. Her iki mekanizma da gerçekleşebilir. $OH\cdot$ radikali DNA'da parçalanmaya, baz kaybına ve zincir kopmalarına yol açmaktadır (Horváthová ve diğerleri, 1998; Anderson ve diğerleri, 2003).

Tüm bu nedenlerden ötürü bu tez çalışmasında DNA hasarının indüklenmesi için kromozom anormallikleri (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testlerinde mitomisin-C (MMC) ile metil metansülfonat (MMS), comet testinde ise hidrojen peroksit (H_2O_2) mutajen olarak kullanılmıştır.

Kanser kemoprevansiyonu, kanserin indüksiyonunu önlemek, inhibe etmek veya ilerlemesini geciktirmek için ajanların kullanılmasıdır. Bu ajanlar, kanserojen maddelerin kritik hedef bölgeye ulaşmasını veya bunlarla reaksiyonunu önleyen bloke edici ajanlar veya tümör sürecini engelleyen baskılayıcı ajanlardır. Bloke edici ajanlar tümör başlamasının inhibitörü iken, baskılayıcı ajanlar tümör ilerlemesinin inhibitörleridir (De Flora ve Ferguson, 2005; Kharma ve diğerleri, 2020; Suvana ve diğerleri, 2020).

Antimutajenik ajanlar, mutajenlerin ve kanserojenlerin etkisinin azaltılmasında ve bağırsak sağlığının korunmasında hayati role sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar daha fazla kemopreventif potansiyele sahip gıda bileşenlerini ve bunların kombinasyonlarını belirlemeye odaklanmıştır. Bu nedenle sağlık açısından önemli özelliklere sahip fonksiyonel

gıdalar dikkat çekmektedir. Özellikle probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler açısından zengin beslenme, gıda kaynaklı mutajenlerin ve kanserojenlerin giderilmesinde kemopreventif ajan olarak kullanılabilmektedir (Ambalam ve diğerleri, 2016).

Genotoksik etkilerin inhibisyonunda, antioksidan aktivite ve serbest radikallerin temizlenmesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve sinyal transdüksiyon modülasyonu gibi çeşitli mekanizmalar rol oynayabilmektedir (Vlckova ve diğerleri, 2006).

Antimutagenезin ana mekanizmaları;

- 1- Kimyasal veya enzimatik inaktivasyon (Reaktif mutajenlerin kimyasallar veya enzimler tarafından doğrudan inaktive edilmesi),
- 2- Aktif tür oluşumunun engellenmesi (Mutajenlerin aktif tür oluşturarak DNA ile reaksiyona girmesini sağlayan metabolik aktivasyonun engellenmesi),
- 3- Süpürme (Desmutajenlerin, mutajenlere bağlanma yoluyla onların DNA ile reaksiyona girmesini engellemesi) ve
- 4- Antioksidan serbest radikal süpürme (DNA'ya zarar verebilen, genotoksisite ve sitotoksisiteye neden olabilen serbest radikallerin antioksidan mekanizmalar ile temizlenmesi) olarak tanımlanmaktadır (Bhattacharya, 2011).

Çeşitli antimutajenik ajanların, çoklu mekanizmalar aracılığıyla mutajenlere karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin birden fazla etkinlik göstermesi, antimutajenik aktivitenin de artmasını sağlamaktadır. Bu nedenle çok işlevli antimutajenleri aramak büyük önem taşımaktadır (Bhattacharya, 2011).

Antioksidanlar küçük konsantrasyonlarda bile bir substratın oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren maddelerdir. Endojen (vücutta sentezlenen) ve ekzojen (diyetle alınan) antioksidanlar yüksek miktardaki serbest radikali nötralize ederek ve hücreleri toksik etkilerden koruyarak serbest radikallerin zararlı etkilerini engeller. Böylece vücutta homeostazı sağlar (Asmat ve diğerleri, 2016; Gulcin, 2020; Swallah ve diğerleri, 2020). İdeal bir antioksidanın kolay emilim, biyolojik olarak bozunabilme, düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilme, ROT oluşumunu önleme, serbest metal iyonlarını

şelatlama ve düşük toksisite gibi özellikleri olmalıdır (Poprac ve diğerleri, 2017; Andrew ve Jayaraman, 2020). Antioksidanlar, radikal temizleyici, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı, elektron verici ve metal şelatlayıcı maddeler olarak işlev görmektedir (Lobo ve diğerleri, 2010).

Flavonoidler ve fenolik asitler antioksidan olarak kullanılmak için büyük bir potansiyele sahip olsalar da bağırsak epitel emilimi için uygun olmayan molekül boyutları, miktar sınırlamaları, bir ilaç molekülü olarak kan-beyin bariyerini geçememe gibi nedenlerle antioksidan moleküller olarak kabul edilecek belirli niteliklerden yoksunlardır (Carocho ve Ferreira, 2013). Ayrıca kanıtlar sentetik antioksidanların hem yararlı hem de zararlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sentetik katkı maddelerinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelmek için mikrobiyal EPS gibi doğal antioksidanların kullanılması gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinden (LAB) alınan EPS'ler doğal antioksidanlardır. İnsan sağlığının korunmasında, hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol oynadıkları için güvenli oldukları bildirilmiştir (Adesulu-Dahunsi ve diğerleri, 2018). Mikrobiyal kaynaklardan üretilen EPS'ler gibi doğal polimerlerin biyoyumluluk, biyolojik olarak bozunabilirlik, toksik olmama, düşük konsantrasyonlarda bile etkili olma ve yenilenebilirlik gibi özellikleriyle antioksidan bileşik olma uygunluğunun kabul edilebilir olduğu belgelenmiştir (Demirci ve diğerleri, 2017). Bu nedenle doğal antioksidanlar, koruyucu maddeler, ilaç geliştirme, katkı maddeleri ve fonksiyonel gıdalar gibi gelecekteki uygulamalar için önemlidir (Andrew ve Jayaraman, 2020). Mevcut bilgilere göre, antioksidan aktivite oldukça arzu edilen bir özelliktir, çünkü bileşiklerin antimutajenik etkilerine atfedilebilir. Bu nedenle, antioksidan aktivite sergileyen herhangi bir bileşiğin antimutajenik potansiyelini araştırmak önemlidir (Ślarczyńska ve diğerleri, 2014). Bu nedenle tez çalışmasında EPS_{KC27L}'nin *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde incelenmiştir.

İnsan periferik lenfositleri, özellikle T lenfositleri, kolay elde edilebilmeleri, uzun ömürlü olmaları ve çok sayıda hücre bulundurmaları nedeniyle hücre kaynağı olarak genotoksikite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücrelerdir. Hedef dokudan geçerken muhtemel genetik hasarı da biriktirdikleri için genotoksik kimyasallara maruz kalmayla ilgili olarak organizmanın genel durumunu yansıtır (Suspiro ve Prista, 2011; Bausinger ve Speit, 2016; Velickova ve Milev, 2020). Lenfositler, döngüsüz primer hücrelerdir (G0 hücreleri). Uygun kültür ortamı ve fitohemaglutinin (PHA) gibi mitojenler ile hücre

döngüsüne girerek bölünürler (Mosesso ve diğerleri, 2016). Fitohemaglutinin (PHA) gibi bazı bitki lektinleri özellikle T lenfositler olmak üzere lenfosit bölünmesini uyarır. Bu sayede elde edilen az miktardaki periferik kandan çok sayıda diploid hücre edilebilir ve maruziyetin etkileri gözlenebilir (Registre ve Proudlock, 2016).

Metafazda gözlenen anormallik türü, mutajenin tipine ve uygulandığı hücre döngüsü fazına bağlıdır (Mosesso ve diğerleri, 2016). Kromozomal anormallikler, sayısal ve yapısal değişiklikleri içermektedir. (Suspiro ve Prista, 2011). Yapısal anormallikler, doğrudan DNA kırılması, hasarlı bir DNA'nın replikasyonu, DNA sentezinin inhibisyonu ve diğer mekanizmalar (örneğin topoizomera II inhibitörleri) ile indüklenebilir. Oluşan DNA kırıkları, kromozomun orijinal haline geri döneceği şekilde yeniden düzenlenebilir, yanlış bir şekilde yeniden birleşebilir veya hiç birleşmeyebilir (Mateuca ve diğerleri, 2006). DNA tek ve çift zincir kırıkları kromozomal anormallikler ve genomik kararsızlıkla ilişkilidir. Genomik kararsızlık ise doğrudan malignite ile ilişkilidir (Araldi ve diğerleri, 2015; Ahmed ve Hidayat, 2020; Vodenkova ve diğerleri, 2020). Morfoloji ve mekanizmaya göre kromozom tipi ve kromatid tipi olarak iki grupta incelenebilir. Kromozom tipi anormallikler, bir veya daha fazla kromozom üzerindeki her iki kardeş kromatidin aynı lokusunu etkilemektedir. Hücre döngüsünün $G_0 - G_1$ fazlarında DNA çift zincir kırıklarının onarılmaması nedeniyle oluşmaktadır. DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonu ile her iki kromatidde oluşan simetrik lezyonlar kromozom tipi anormalliklerin (disentrik ve halka kromozomu gibi) gözlenmesine neden olmaktadır. Çoğunlukla S-fazından bağımsız klastojenler tarafından oluşturulmaktadır. İyonize radyasyon bu tip anormalliklerin oluşuma sebep olmaktadır. Kromatid tipi anormallikler ise, bir veya daha fazla kromozom üzerindeki kardeş kromatidlerin yalnızca birinde oluşmaktadır. Hücre döngüsünün S fazında gerçekleşen bazı değişimleri, çapraz bağlar ve tek zincir kırıklarından kaynaklanmaktadır. S-fazına bağımlı klastojenler (çoğu kimyasal) bu tip anormalliklerin oluşumunu indüklerler (Mateuca ve diğerleri, 2006; Suspiro ve Prista, 2011). Kardeş kromatidlerde birleşme, iki kardeş kromatidin terminal bölgelerindeki delesyonlar nedeniyle oluşan kırık uçlarının yeniden birleşmesi ile oluşmaktadır (Savage, 1976). Kromatid değişimi, quadriradial (dörtlü) veya triradial (üçlü) kromozomlar şeklinde görülmektedir. Bunlar interkromozom yani kromozomlar arası değişimler sonucu oluşmaktadır. Quadriradial kromozomlar, iki farklı kromozomun iki komşu bölgesinde meydana gelen kromatid kırıklarının simetrik veya asimetrik meydana gelecek şekilde yeniden birleşmesiyle oluşurken, triradial kromozomların önemli bir mekanizması, tek bir kromatid kırığı ve aynı yerde meydana gelen

tek bir izokromatik kırılmadır (Satoh ve diğ erleri, 2002). Disentrik kromozom, iki kırık kromozomun sentromerik parçaları arasında bir değişim ile meydana gelmektedir (Cao ve diğ erleri, 2013). Ökaryotik genomlarda nadiren meydana gelen dairesel DNA molekülleri olan halka kromozomlar genellikle her iki kromozom kolunun uçlarında oluşan kırıkların halka şeklinde füzyonundan kaynaklanır. Değişken boyutta ve genetik içerikte olabilirler, genetik materyal kaybına yol açarlar. Herhangi bir kromozomda oluşabilmekle beraber tüm insan kromozomlarında da raporlanmıştır (Guilherme ve diğ erleri, 2011; Yip ve diğ erleri, 2015; Pristiyazhnyuk ve Menzorov, 2018).

Yapısal anormallikler, DNA'nın kırılmasıyla ind klendiğinden, hücrenin hayatta kalması bu kırıkların durumuna bağlıdır. Kırıklar, kromozomun orijinal durumuna geri dönecek şekilde birleşebilir, yanlış şekilde birleşebilir veya hiç birleşmeyebilir. Son iki durumun gerçekleşmesi halinde oluşan anormallikler mikroskop ile gözlenebilir. Hücrenin yaşamı, oluşan kromozomal anormalliğin türüne göre değişkenlik gösterebilir. Disentrik kromozom, halka kromozom ve fragmentler gibi kararsız anormallikler taşıyan hücreler apoptoz yoluyla elimine edilebilir. Diğ er taraftan dengeli translokasyonlar gibi kararlı anormallikler, apoptotik hücre ölümüne neden olmada çok daha az etkili oldukları için organizma için zararlı sonuçlara yol açabilmektedir (Mateuca ve diğ erleri, 2006; Mateuca ve diğ erleri, 2012). Sayısal anormallikler, anormal kromozom ayırımına bağlı olarak ortaya çıkan normal kromozom sayısındaki değişiklikleri (anöploid, poliploid) ifade etmektedir. Kendiliğinden veya an jen maruziyeti nedenleriyle oluşabilmektedir (Mateuca ve diğ erleri, 2006). Sayısal anormallikler her zaman genotoksik ajan tarafından ind klenmeyebilir, hücre bölünmesinin uzaması veya karışıklığı sonucu oluşabilir (Mosesso ve diğ erleri, 2016). Poliploid, haploid kromozom sayısının tam katları kadar artış olarak tanımlanmaktadır (Kirsch-Volders ve diğ erleri, 2002). Endoreduplikasyon, hücrenin mitoz geçirmeden tekrar bir S fazına girmesi ile oluşur. DNA içeriğinin arttığı bu durumda, önceki kromatidlerden iki kromatid içeren yeni kromozomlar meydana gelir. Metafazda birbirinden ayrılmamış dört kromatidli yapı olarak görünür (Okello ve diğ erleri, 2016).

Bu tez çalışmasında EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında, anormal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını kontrole göre anlamlı düzeyde artırmadığı bulunmuştur. Ayrıca EPS_{KC27L}, her iki uygulama süresinde de MMC ve MMS mutajenlerinin neden olduğu anormal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını pozitif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde azaltmıştır. EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamaları insan lenfositlerinde çeşitli yapısal ve sayısal

anormallikler gözlenmiştir. Bu üç uygulama tipinde ortak olarak gözlenen anormallikler; kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve poliploididir. Kromatid değişimi EPS_{KC27L}'nin tek başına muamelesinde sadece 50 µg/mL konsantrasyonda (48 saatlik uygulama süresinde) gözlenirken, EPS_{KC27L} + MMC muamelesinin tüm konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Disentrik kromozom, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS muamelelerinde görülmüştür. Halka kromozom ve endoreduplikasyon ise yalnızca EPS_{KC27L} + MMC uygulamasında (50 µg/mL, 24 saatlik uygulama süresi) gözlenmiştir.

MMC, mitotik açıdan inaktif olan insan lenfositlerinin bölünme için uyarılmalarıyla birlikte yoğun hasarlara yol açmaktadır. Metilleyici ajanlar ise, abazik bölge oluşumuna neden olarak DNA replikasyonunu bloke ederler. Hücrenin bu durumlarda mitozu devam etmesiyle kromozomal anormallikler oluşur (Nowell, 1964; Schwartz, 1989). Alkillenmiş DNA, tamir edilmediğinde geri dönüşü olmayan DNA tek ve çift zincir kırıklarının oluşumuna neden olmaktadır (Puyo ve diğerleri, 2014). Çift fonksiyonlu alkilleyici ajanlar, memeli hücrelerinde kromozom anormalliklerini indüklemeye tek fonksiyonlu alkilleyici ajanlardan daha etkilidir (Natarajan, 2002). Çalışmada kullanılan, bir çift fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMC ve tek fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMS'nin kromozomal anormallik oluşumuna etkisi bu sonuçlarla tutarlıdır. Bir klastojen olan MMS'nin, kromozom fragmentlerini indüklediği raporlanmıştır (Kirsch-Volders ve diğerleri, 2002). Çalışmada da en yoğun fragment oluşumu EPS_{KC27L} + MMS muamelelerinde gözlenmiştir. MMC'nin memeli hücrelerinde DNA çapraz bağlarına neden olarak kromatid değişimini etkili bir şekilde indüklediği bilinmektedir (Satoh ve diğerleri, 2002; Ünal ve diğerleri, 2013). Kromatid değişimi EPS_{KC27L} + MMC muamelesinin tüm konsantrasyonlarında gözlenirken EPS_{KC27L} + MMS muamelelerinde ise bu anormallik türü gözlenmemiştir. Çalışmada elde edilen bu veriler literatür ile uyumludur. EPS_{KC27L}'nin uygulanan sürelerde ve konsantrasyonlarda genotoksik etkilere neden olmadığı saptanmıştır. Ayrıca elde edilen veriler bu EPS'nin MMC ve MMS gibi alkilleyici ajanların neden olduğu genotoksik hasarları azaltıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. KA testi gibi kanserogenez ile bağlantılı bir testte bu sonuçların elde edilmesi EPS_{KC27L}'nin *in vitro* ortamda herhangi bir genotoksik hasara neden olmadığını, aksine klastojenik ajanların neden oldukları etkiye karşı da antiklastojenik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çift fonksiyonlu alkilleyici ajanlar DNA'da çapraz bağlara neden olmaktadır. Onarılmayan lezyonlar DNA replikasyonu ile çift zincir kırıklarına dönüşmektedir (Puyo ve diğerleri, 2014). DNA çift zincir kırıkları homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme mekanizmaları ile onarılabilir. Homolog rekombinasyon onarım mekanizması hasarlı DNA'nın onarılması için DNA'nın homoloğu olan kardeş kromatidi şablon olarak kullanmaktadır (Kondo ve diğerleri, 2010). Bu da kardeş kromatid değişimlerine (KKD) yol açmaktadır. Homolog olmayan uç birleştirme mekanizmasında ise DNA uçları ya çok az homoloji ile ya da hiç homoloji olmadan birleşmektedir (Fu ve diğerleri, 2012). İkinci S fazından sonra hücre döngüsünün durması nedeniyle hücrelerinin çoğu ölmektedir. Ancak hayatta kalan hücreler hatalı replikasyon çatallarında çift zincir kırıklarının onarımının göstergesi olan yüksek kardeş kromatid değişimi sıklığı göstermektedir (Kondo ve diğerleri, 2010; Udrou ve Sgura, 2017).

Kardeş kromatid değişim (KKD) testi, farklı fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik potansiyelinin araştırılması için kullanılan oldukça hassas bir metoddur (Eke ve Celik, 2008; Stults ve diğerleri, 2020). KKD, kromozomal anormallik oluşumu için gereken konsantrasyondan çok daha düşük konsantrasyonlarda genotoksik etkilerin tespit edilmesini sağlamaktadır. (Suspiro ve Prista, 2011). KKD testi OCED tarafından 2014 yılında test klavuzundan çıkarılmıştır (Ünal ve diğerleri, 2016). Ancak DNA onarım çalışmalarında ve genetik toksikolojide *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanmaktadır (Eke ve Celik, 2008). Genotoksik ajanların çoğu KKD frekansının artmasına neden olurken, antigenotoksik etkileri de bulunan antioksidanlar bu frekansın azalmasını sağlamaktadır (Avuloğlu-Yılmaz ve diğerleri, 2017; Al-Dulaimi ve diğerleri, 2020).

KKD frekansı, EPS_{KC27L}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının hiçbir konsantrasyonunda anlamlı oranda değişmemiştir. EPS_{KC27L}, tüm konsantrasyonlar ve uygulama sürelerinde, MMC ile MMS mutajenlerinin artırdığı KKD frekansını pozitif kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı oranda azalmıştır. Çift fonksiyonlu alkilleyici ajanların, KKD'leri indüklemeye tek fonksiyonlu olanlara göre daha etkili olduğu raporlanmıştır (Bodell, 1990). Çalışmada kullanılan, çift fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMC'nin, tek fonksiyonlu alkilleyici ajan olan MMS'ye göre KKD oluşumunda daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, çift fonksiyonlu alkilleyici ajanların, tek fonksiyonlu ajanlara kıyasla kromozomal anormallikleri indüklemeye daha etkili olduğu bulgularıyla tutarlıdır (Perry ve Evans, 1975).

Elde edilen sonuçlar ve literatür verileri, KA ve KKD testi sonuçlarının uyumlu olduğunu desteklemektedir.

DNA hasarına spesifik hücresel yanıtlar DNA'nın onarılması, hücre döngüsünün durması ve apoptozdur (Pawar ve diğerleri, 2009). Kimyasallara ve diğer genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gözlemlenen en önemli hücresel yanıtlardan biri, hücre döngüsünün inhibisyonu veya gecikmesidir. Hücre proliferasyon indeksi veya replikasyon indeksi (Rİ) ve mitotik indeks (Mİ), yetersiz hücre proliferasyonunun göstergeleri olarak insan periferik kan lenfosit kültürlerinde çeşitli bileşiklerin sitotoksitesini belirlemek için kullanılmaktadır (Eke ve Celik, 2008; Al-Dulaimi ve diğerleri, 2020). Mitotik indeks, hücre yapısında veya işlevindeki değişikliklerin değerlendirilmesi, hücre bölünme frekansının ölçülmesi için güvenilir bir belirteçtir. Mitotik indeksin yüksek olması, hücre proliferasyonunun hızlı olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Zeweil ve diğerleri, 2015). Mitotik indeksteki azalma, hücre bölünme kapasitesi kaybı veya hücre ölümüne neden olan mekanizmaların aktivasyonu nedenleriyle gerçekleşebilir. ATP seviyesinin düşmesi, enerji üretimi mekanizmalarındaki hatalar ve ATPaz'ların inhibisyonu nedeniyle mitokondri fonksiyonunda gerçekleşen bozulmalar da bu düşüşün nedenlerinden olabilir. Mutajenler fazlar arasında herhangi bir noktada hücre büyümesinin durmasına neden olabilir. Hücrelerin, hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında kalması, mitozun başlamasını sağlayan G2 fazının engellenmesi veya bu fazın uzun sürmesi yollarıyla gerçekleşebilir. DNA sentezinin engellenmesi ve apoptozun indüklenmesi de hücre proliferasyonunu engelleyerek ve mitotik aktivasyonun azalmasına neden olan faktörler arasındadır (Jain ve Andsorbhoy, 1988; Szende ve diğerleri, 2000; Tchah ve diğerleri, 2003; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2006; Azab ve diğerleri, 2017; Rodriguez-Mercado ve diğerleri, 2017). Antibiyotik ve antikanser ajanı olarak kullanılan MMC, hücre bölünmelerini belirgin şekilde inhibe etmektedir (Nowell, 1964). Ayrıca MMS'nin, zar geçirgenliğini artırma yeteneği aracılığıyla sitotoksite gösterdiği bilinmektedir (Khan, 2019). Çalışmada EPS_{KC27L}'nin tek başına uygulaması sonucunda her iki uygulama süresinde de sadece en yüksek konsantrasyon (100 µg/mL) mitotik indeksi kontrol grubuna göre önemli oranda düşürmüştür. MMC ve MMS muameleleri (pozitif kontroller), mitotik indeksi kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde düşürmüştür. EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarının, değerlendirilen tüm konsantrasyonlarında düşen mitotik indeksi pozitif kontrollere kıyasla anlamlı oranda artırdığı bulunmuştur. EPS_{KC27L}'nin hem tek başına hem

de MMC ve MMS ile muameleleri replikasyon indeksinde anlamlı değişikliğe neden olmamıştır.

Mikronükleuslar, asentrik kromozom/kromatid fragmentlerinden veya anafazda geride kalan ve telofazdaki çekirdeklere dahil olmayan tüm kromozomlardan/kromatidlerden oluşan küçük, ekstrasükleer cisimlerdir (Dos Santos ve diğerleri, 2013). Mikronükleus oluşumunun altında yatan mekanizmalar iyi anlaşılmıştır. Mikronükleuslar klastojenik etki nedeniyle kromozomun kırılması ile oluşan asentrik fragmentlerden veya anöjenik olaylardan kaynaklanan tam bir kromozomdan oluşabilir. Klastojenik ajanlar esas olarak kromozomal fragment oluşumunu indüklemektedir. Anöjenik ajanlar ise mitotik aparata müdahale ederek mitoz sırasında kromozomların yanlış ayrışmasına, dolayısıyla kromozom kaybına neden olmaktadır (Hintzsche ve diğerleri, 2017). Kromozomal fragmentleri içeren mikronükleuslar, doğrudan DNA çift zincir kırılmalarından, tek zincir kırıklarının DNA replikasyonundan sonra çift zincir kırıklarına dönüştürülmesinden veya DNA sentezinin inhibisyonundan kaynaklanabilir. Tüm kromozomları içeren mikronükleuslar ise hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksiklikler, mitotik iğ, kinetokor veya mitotik aparatındaki bozukluklar, kromozomal alt yapıların hasar görmesi ve sentromerik DNA'nın hipometilasyonu nedenleriyle oluşabilmektedir (Mateuca ve diğerleri, 2006). MN yalnızca bölünen hücrelerde genetik hasarları gösterir ve 1000'den fazla iki çekirdekli (binükleat) hücreyi analiz ettiği için büyük bir istatistiksel güce sahiptir (Araldi ve diğerleri, 2015). Bu testte iki çekirdekli hücreler elde etmek amacıyla kullanılan Sitokalsin B (cyt-B), aktin oluşumunu inhibe eden, mitotik iğ inhibitörüdür. Nükleer bölünmesini tamamlayan hücrelerin sitokenezini bloke ederek yavru hücrelerin ayrılmasını önler ve iki çekirdekli hücrelerin oluşumuna yol açar (Hovhannisyan, 2010; Velickova ve Milev, 2020). EPS_{KC27L}'nin tek başına uygulanması sonucunda MN frekanslarında kontrole kıyasla anlamlı değişimler görülmemiştir. Dolayısıyla genotoksik bir etkisi belirlenmemiştir. EPS_{KC27L} + MMC uygulamasında, en düşük konsantrasyon (12,5 µg/mL) hariç tüm konsantrasyonlarda istatistiksel anlamda bir azalma gözlenmiştir. EPS_{KC27L} + MMS uygulamasında ise bu parametredeki azalmalar tüm konsantrasyonlar için istatistiksel açıdan anlamlıdır. Dolayısıyla MN testi sonuçları da EPS_{KC27L}'nin antijenotoksik potansiyelini desteklemektedir.

Nükleer bölünme indeksi (NBİ), hücre proliferasyonunun ve sitotoksitenin değerlendirilmesini sağlayan bir diğer belirteçtir (Ionescu ve diğerleri, 2011).

Hesaplanmasında normal sitoplazma ve nükleer morfolojiye sahip, mononükleer (bölünme geçirmeyen), binükleer (bir kez bölünen) ve plurinükleer (birden fazla bölünen) hücrelerin frekansları değerlendirilir (Mosesso ve diğerleri, 2016). EPS_{KC27L}, EPS_{KC27L} + MMC ve EPS_{KC27L} + MMS uygulamalarının hiçbirinde NBI'de istatistiksel açıdan anlamlı değişimler gözlenmemiştir.

Comet, tek hücre düzeyinde DNA hasarını saptayan bir jel elektroforez yöntemidir. Görüntü analizi ile her bir 'kuyruklu yıldız' için farklı parametreler hesaplanmaktadır; en sık kullanılanlar kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu (% kuyruk DNA'sı) ve kuyruk momentidir. Düşük hasar düzeyinde iyi bir alternatif olan kuyruk uzunluğu, comet başı ile kuyruğunun son görünür noktasına kadar olan mesafedir. Kuyruk yoğunluğu, kuyruktaki DNA fragmentlerinin yüzdesidir. Bu parametre geniş hasar aralığını kapsamakla birlikte kırılma sayısı ile doğru orantılıdır. Deney koşullarından etkilenmediği ve kolay yorumlanabildiği tercih edilmektedir (Karlsson, 2010; Burlinson, 2012; Ghebretinsae ve diğerleri, 2013). Cometin geliştirilen farklı modifikasyonları eksik eksizyon onarımı ile ilişkili DNA tek zincir kırıkları, DNA çift zincir kırıkları, DNA çapraz bağları, alkali kararsız bölgeleri, bazlarda/şekerlerdeki hasarlar nedeniyle kendiliğinden ve/veya baz eksizyon onarımı sırasında ara ürünler olarak ortaya çıkabilen abazik bölgeler ve oksidatif DNA hasarı gibi farklı DNA hasarı formları ile apoptoz ve nekrozu ölçmek için önerilmiştir (Gyori ve diğerleri, 2014; Karlsson ve diğerleri, 2015; Mosesso ve diğerleri, 2016; Möller ve diğerleri, 2020; Cordelli ve diğerleri, 2021). Comet testi ile tespit edilen DNA hasarı sadece genotoksik etkilerden değil, aynı zamanda sitotoksik etkilerden kaynaklanan nekroz ve apoptoz ile ilişkili DNA bozulmasından da kaynaklanabilir (Suspiro ve Prista, 2011). H₂O₂ hücrelerde oluşan oksidatif hasar kaynağı olup tek ve çift zincir kırıkları da dahil pek çok DNA lezyonuna neden olabilir (Benhusein ve diğerleri, 2010). EPS_{KC27L}'nin genotoksik ve H₂O₂ mutajeninin neden olduğu DNA hasarına karşı antigenotoksik etkisi comet testi ile araştırılmıştır. EPS_{KC27L}'nin hiçbir konsantrasyonu kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde kontrole göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Ayrıca H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını, tüm parametrelerde pozitif kontrole göre anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür.

Genel olarak farklı mikroskop teknikleri, çeşitli ajanların toksik, sitotoksik, genotoksik ve mutajenik potansiyellerinin değerlendirilmesine katkıda bulunabilir. Taramalı elektron mikroskobu (*Scanning Electron Microscope*, SEM), hücre yüzeyinin üç boyutlu bir

görünümünü sağlar. SEM’de üç boyutlu görüntünün oluşumu, kaplanmış doku yüzeyine çarpan ve saçılan elektronların dedektör ile toplanma prensibine dayalıdır (Fontanetti ve diğerleri, 2010). EPS_{KC27L} ve EPS_{KC27L} + MMC uygulamaları sonucunda SEM’de gözlenen lenfosit ve eritrositlerde belirgin fark görülmemiştir. EPS_{KC27L} ve MMC hücrelerde değişikliğe neden olmamıştır. EPS_{KC27L} iki fraksiyonlu bir yapıdadır ve SEM analizinde bu yapılar gözlenmiştir. EPS_{KC27L}’nin iç yüzeyinin gözenekli ve kompakt mikroyapıda, dış yüzeyinin ise pürüzsüz yapıda olduğu gözlenmiştir. SEM analizi kullanılarak mikrobiyal EPS’lerin yapısının incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. *Streptococcus thermophilus* CC30’dan elde edilen EPS, küresel ve gözenekli yapıdayken *Lactobacillus plantarum* YW11’den elde edilen EPS gözenekli ve ağ benzeri yapıdadır. Ayrıca yüzeyi pürüzsüz ve ışıltılıdır (Wang ve diğerleri, 2015; Kanamarlapudi ve Muddada, 2017). Ayrıca *Lactobacillus fermentum* CFR2195’ten elde edilen EPS’nin pullu ve kompakt, *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146’dan elde edilen EPS’nin gözenekli ve ağ benzeri yapıda, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 ve *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205 bakterilerinden elde edilen EPS’lerin ise pürüzsüz filamentler şeklinde olduğu raporlanmıştır (Majumder ve Goyal, 2009; Yadav ve diğerleri, 2011; Prasanna ve diğerleri, 2012). EPS’lerin farklı morfolojisi ve topografyası, onların fizikokimyasal özelliklerine, numune ekstraksiyonuna, hazırlanma ve saflaştırma aşamalarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kanamarlapudi ve Muddada, 2017).

EPS_{KC27L}’nin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak diğer prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal kaynaklı EPS’lerin genotoksik/antigenotoksik, mutajenik/antimutajenik ve antioksidan özelliklerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır.

Lactobacillus acidophilus 606’dan elde edilen çözünür polisakkaritlerinin (0,1 mg/mL ve 10 mg/mL) kolon kanseri hücrelerinin (HT-29, CX-1, WiDr ve DLD-1) ve insan embriyonel fibroblastları (hEF) hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibe edici etkisi MTT testi ile incelenmiştir. Sonuçta kanser hücrelerine karşı yüksek antikanser aktivite gösterdiği ve normal hücrelerin büyümesini yalnızca %20 oranında azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca, DPPH serbest radikalini yüksek derecede süpürme aktivitesi göstererek güçlü antioksidatif aktivite sergilemiştir. Polisakkaritin kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme yeteneğinin apoptotik proteinlerin modülasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Proteomik analizde

Bcl-2 ile etkileşen protein ve hücre bölünmesi döngüsü proteinlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde düzenlendiği de raporlanmıştır (Choi ve diğerleri, 2006).

Lactobacillus plantarum RJF4 kaynaklı EPS, glikoz ve mannoz birimlerinden oluşmaktadır. Bu EPS'nin farklı konsantrasyonları (1, 10, 100 ve 1000 µg/mL) MTT ve Alamar Blue testleriyle sitotoksik etkileri araştırılmıştır. MiaPaCa2-pankreas kanseri hücre hattına özgü ve konsantrasyona bağlı bir şekilde antiproliferatif etkide olduğu ve normal hücre hatlarına (L6 ve L929 fibroblast hücreleri) toksik etkisi olmadığı raporlanmıştır. Yapılan *in vitro* antioksidan analizlerinde EPS'nin, toplam antioksidan kapasiteye (%32), DPPH radikali süpürme yeteneği (%23,63) ve indirgeme potansiyeline (%50) sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle EPS'nin, güçlü bir antioksidan olan askorbik asit ile karşılaştırılabilir antioksidan aktiviteye sahip olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, *in vitro* deneylerle kolesterolü düşürücü etki ve α-amilaz enzimini inhibe etme yeteneği sergilediğinden antidiyabetik özellik gösterdiği de kabul edilmiştir. Elde edilen bu veriler, EPS'nin sağlık alanında kullanılabileceğini göstermektedir (Dilna ve diğerleri, 2015). EPS_{KC27L}'nin (0,5 ve 1 mg/mL) DPPH radikalini süpürme yeteneği (%73,4 ve %79,6), demir iyonu şelatlama yeteneği (%18,6 ve %24,9) ve süperoksit anyon radikali (O₂⁻) süpürücü aktivitesi (%44,8 ve %61,6) olduğu bilinmektedir. Ayrıca 0,5 mg/mL inülinin antioksidan aktivitesi bulunmazken, 1 mg/mL inülinin EPS_{KC27L}'den daha az antioksidan aktivitesi bulunmaktadır. Bu sonuçlar EPS_{KC27L}'nin ticari olarak sıklıkla kullanılan inülininden daha etkin antioksidan kapasitesinin olduğunu göstermektedir (Çelik, 2018).

2011 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada *Lactobacillus casei* 01 suşundan izole edilen EPS'nin (5, 10, 50 ve 100 µg/mL, 24 saat) insan kolon kanser hücre hattında (HT29) proliferasyon üzerine etkileri ve insan bağırsak epitel hücre hattında (intestine 407) sitotoksik etkisi MTT hücre canlılığı testi incelenmiştir. Ayrıca EPS'nin (10 ve 50 µg/mL) 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO; 0,03 µg/mL) sitotoksitesisi ve genotoksitesisi üzerine etkileri MTT ve comet testleri ile analiz edilmiştir. EPS 5-50 µg/mL konsantrasyonlarda intestine 407 hücrelerinin canlılığına etki göstermezken 100 µg/mL'lik konsantrasyonu hücre canlılığını düşürmüştür. EPS ayrıca HT-29'un proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe edebilmiştir. Ayrıca EPS'nin kullanılan konsantrasyonlarda 4-NQO'nun neden olduğu DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı ve EPS'nin intestine 407 hücrelerinde 4-NQO'nun azalttığı hücre sitotoksitesisi üzerine antisitotoksik bir etki gösterdiği saptanmıştır. EPS'nin antisitotoksik etkiyi 4-NQO'nun hasar verdiği bağırsak 407 hücrelerinde tamir ile

gösterdiği ve böylece bloke edici ve biyoantisitotoksik etki göstermiş olabileceği bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2011).

Levan ekzopolisakkariti gıdalarda stabilizatör, kıvam arttırıcı ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. 2013 yılında yapılan bir çalışmada Natto adlı bir Japon gıdasında bulunan *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen levanın sitotoksik ve mutajenik etkileri Çin hamster ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) MTT ve MN testleri ile incelenmiştir. Levanın MTT testinde kullanılan konsantrasyonlarının (80, 160, 240, 320 ve 400 mg/mL, 24 saat) sitotoksik etkide olmadığı ve MN için kullanılan konsantrasyonlarının da (400 ve 1200 mg/mL, 24 saat) MN sıklığını anlamlı bir şekilde arttırmadığı ve dolayısıyla genotoksik etki sergilemediği gözlenmiştir. Sonuçlara göre bu bileşiğin toksikolojik ve mutajenik açılarından güvenli olduğu ve gıda katkı maddesi olarak kullanımına ek olarak yeni endüstriyel alanlarda da kullanılabileceği belirtilmiştir (Dos Santos ve diğerleri, 2013).

Lasiodiplodan (LS), *Lasiodiplodia theobromae* mantarı tarafından üretilen bir β -(1→6)-D-glukandır. Hipoglisemik, antikoagülan, antiproliferatif ve antikanser aktivitelerinin olduğu raporlanan lasiodiplodan ekzopolisakkaritin (LS) genotoksik ve doksorubisin (DXR)'e karşı antigenotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada Wistar ratlarına LS (5, 10 ve 20 mg/ kg vücut ağırlığı, 15 gün) oral olarak ve DXR (15 mg/kg vücut ağırlığı, 14. gün) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kan hücreleri ve hepatositlerde comet, periferik kan hücreleri ile kemik iliği hücrelerinde de MN testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre LS tek başına DNA hasarına neden olmamıştır. LS'nin periferik kan hücrelerinde, DXR'in oluşturduğu MN frekansını en düşük konsantrasyonda (5 mg/kg vücut ağırlığı) %89 oranında, en yüksek konsantrasyonda ise (20 mg/kg vücut ağırlığı) %65 oranında azaltmakla birlikte kemik iliği hücrelerinde de DNA hasarını yaklaşık %80 oranında azalttığı görülmüştür. Comet testi sonuçlarında da benzer antimutajenik aktiviteler sergilediği raporlanmıştır. Ayrıca DNA hasarı ile ilişkili genlerin ifadesi PCR ile incelenmiştir. Bunun için 10 mg/ kg vücut ağırlığı LS, 15 mg/kg vücut ağırlığı DXR ve 10 mg/ kg vücut ağırlığı LS + 15 mg/kg vücut ağırlığı DXR uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre ise LS tek başına DNA hasarı ile ilgili genlerin (Nükleotit ve baz eksizyon tamiri, yanlış eşleme tamiri, çift zincir kırık tamiri, apoptoz ve hücre döngüsü) ekspresyonunda değişikliğe neden olmazken, DXR'nin neden olduğu gen ekspresyonu hatalarını azaltmıştır. Ancak, bu etkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır (Mello ve diğerleri, 2017).

Kurdlanın mutajenitesinin dört ayrı sistemde incelendiği bir çalışmada değerlendirilen konsantrasyonlarının mutajenik aktivite sergilemediği raporlanmıştır. Ames testi, S9 varlığında ve yokluğunda, *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 ve TA100 suşlarında gerçekleştirilmiştir. Kurdlan değerlendirilen konsantrasyonların (50, 150, 500, 1500 ve 5000 µg/plate) sadece en yüksekinde (TA1538 hariç tüm suşlarda ve S9 yokluğunda) hafif mutajenite sergilemiştir. Fare lenfoma mutasyon deneyi, S9 varlığında ve yokluğunda, 312,5; 625; 1250; 2500 ve 5000 µg/ml konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiş ve mutajenik aktivite gözlenmemiştir. Kurdlan (500, 1000 ve 2000 mg/kg) MN oluşumunu indüklememiştir. KA testi de S9 varlığı ve yokluğunda, 24 ve 48 saatlik muamele süreleri ile Çin hamster yumurtalık hücrelerinde değerlendirilmiş ve sonucunda kurdlanını hiçbir konsantrasyonunun (625, 1250, 2500 ve 5000 µg/ml) kromozomal anormalliğine neden olmadığı gözlenmiştir (Spicer ve diğerleri, 1999).

Aureobasidium pullulans kaynaklı pullulanın mutajenitesi Ames testi ile *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA1535, TA98 ve TA1537 suşlarında değerlendirilmiştir. S9 varlığında ve yokluğunda 10, 100, 1.000 ve 10.000 µg/plate konsantrasyonlarında uygulanan pullulanın mutajenik aktivitesi bulunmamıştır (Kimoto ve diğerleri, 1997).

Tıbbın farklı alanlarında da kullanılan bakteriyel selülozun genotoksik ve siklofosfamide (SF; 2 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) karşı antigenotoksik etkileri MN testi ile araştırılmıştır. Erkek ve dişi İsviçre Webster farelerine gavaj ve intraperitoneal yol ile verilen bakteriyel selüloz (200 mg/kg vücut ağırlığı, 3 gün), uygulamanın ardından alınan kemik iliği hücrelerinde değerlendirilmiştir. Bakteriyel selülozun genotoksik olmadığı ve SF'nin mutajenitesine karşı antigenotoksik olduğu bulunmuştur (Pinto ve diğerleri, 2016).

Botryosphaeria rhodina MAMB-05'ten elde edilen botryosphaera ezkopolisakkaritinin (BOT) sitotoksik, mutajenik, genotoksik ve koruyucu etkileri incelenmiştir. Bunun için Çin hamster akciğer fibroblastları (V79) ve rat hepatokarsinom hücreleri (HTC) kullanılmış ve bu hücrelerde MTT, MN ve comet testleri gerçekleştirilmiştir. MTT testinde BOT'un on farklı konsantrasyonu (7,5; 15, 30, 60, 100, 150, 200, 300, 450, 600 µg/mL) değerlendirilmiştir. BOT, V79 hücrelerinde (3 saat) sitotoksik bir etki göstermemiştir. Ancak HTC hücrelerinde (24 saat) 300 ve 450 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu uyardığı saptanmıştır. MTT testinin sonuçları baz alınarak gerçekleştirilen MN ve comet testlerinde ise BOT'un üç farklı konsantrasyonu (7,5; 30 ve 100 µg/mL)

incelenmiş ve V79 (3 saat) ve HTC (24 saat) hücrelerinde genotoksik bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada BOT'un (7,5; 30 ve 100 µg/mL, 3 saat) V79 hücrelerinde doksorubisin (DXR; 0,75 µg/mL, 3 saat) ve hidrojen peroksit (H₂O₂; 1,70 µg/mL, 20 dakika) karşı, HTC hücrelerinde ise benzo[a]piren (B[a]P, 20 µg/mL, 24 saat) ve hidrojen peroksit (H₂O₂; 1,70 µg/mL, 20 dakika) karşı antimutajenik etkileri MN testi ile değerlendirilmiştir. BOT hem eş zamanlı hem de geç zamanlı uygulanan protokollerde DXR, H₂O₂ ve B[a]P tarafından indüklenen DNA hasarını azaltarak koruyucu etki ve antioksidan özellik göstermiştir. Elde edilen veriler, BOT'un terapötik ajan olabileceğini göstermektedir (Kerche-Silva ve diğerleri, 2017). BOT ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada bu EPS'nin mutajenik, genotoksik, antigenotoksik ve antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. BOT'un beş farklı konsantrasyonu (75, 150, 300, 450 ve 600 µg/mL) Ames testi ile *Salmonella typhimurium*'un TA98, TA100, TA102, TA97a suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Ayrıca bu konsantrasyonların hidrojen peroksit (H₂O₂; 100 µg/mL) kaynaklı reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimini azaltma kabiliyeti, farklı muamele süreleri (3, 9 ve 24 saat) altında lenfosit kültürlerinde CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) probu kullanılarak araştırılmıştır. BOT'un (7,5; 30,0 ve 100,0 µg/mL, 24 saat) normal ve tümör (Jurkat) insan T lenfosit kültürlerinde genotoksik ve metil metansülfonat (MMS; 10 µM, 4 saat) kaynaklı hasara karşı antigenotoksik etkisi (eş ve geç zamanlı muamele) comet testi ile incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre BOT'un değerlendirilen konsantrasyonları bakterilerde mutajeniteye, normal ve tümör lenfositlerinde de genotoksisiteye neden olmamıştır. Normal lenfositlerde MMS kaynaklı DNA hasarına karşı antigenotoksik etkiyi sadece geç zamanlı muamele uygulamasında; 30,0 (%72,41) ve 100,0 µg/mL (%91,09) konsantrasyonlarda göstermiştir. Tümör hücrelerinde ise bu etkiyi hem eş zamanlı (30,0 µg/mL; %60,71 ve 100,0 µg/mL BOT; %63,39) hem de geç zamanlı (30,0 µg/mL; %64,52 ve 100,0 µg/mL BOT; %61,29) muamele de göstermiştir. MMS'ye karşı sergilediği bu antigenotoksik etkiye karşı H₂O₂ tarafından üretilen reaktif oksijen türlerini, üç farklı uygulama süresinde de azaltamamıştır. Araştırmacılar, BOT'un terapötik bir ajan olarak kullanılmasının uygun olabileceğini açıklamışlardır (Malini ve diğerleri, 2016). BOT'un *in vivo* klastojenik ve antiklastojenik etkilerinin incelendiği diğer bir çalışmada fare periferik kan ve kemik iliği kullanılarak MN testi gerçekleştirilmiştir. BOT'un üç farklı konsantrasyonu (7,5; 15, 30 mg/kg vücut ağırlığı, her gün) farelere 15 gün boyunca gavaj yoluyla verilmiştir. Periferik kan ve kemik iliğinde MN oluşumunu indüklediğinden klastojenik veya anöjenik aktivitesinin olmadığı bulunmuştur. Ayrıca BOT EPS'sinin

siklofosfamide (SF; 50 mg/kg vücut ağırlığı) karşı antiklastojenik etkileri (SF intraperitoneal, eşzamanlı muamele) incelenmiş ve BOT'un SP'nin neden olduğu klastojenik etkiyi önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu azalma, periferik kanda BOT'un artan konsantrasyonlarında (7,5; 15, 30 mg/kg vücut ağırlığı) sırasıyla %45, %78 ve %82 oranındayken, kemik iliğinde %45, %71 ve %78 oranındadır. Mikrobiyal polisakkaritlerin SP'nin neden olduğu hasarı önleyici etkisinin, reaktif hidroksil gruplarını temizlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Miranda ve diğerleri, 2008).

Saccharomyces cerevisiae mayası tarafından üretilen (1→ 3)(1→ 6)-β-D-glukan'ın sitotoksitesisi, genotoksitesisi ve hücre canlılığı üzerine etkileri *in vitro* olarak çin hamster epitel hücrelerinde (CHO-K1) MTT ve comet testleri ile incelenmiştir. MTT testinde ekzopolisakkaritin uygulanan dozlarından (6,25; 12,5; 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL; 3 ve 24 saat) sadece en yüksek dozda (200 µg/mL, 24 saat) mitokondriyal etkinliği azaltan sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Comet testinde çalışılan konsantrasyonlarda (12,5; 25, 50, 100 µg/mL) genotoksik etkisinin olmadığı bulunmuştur. CM-G ile yapılan hücre canlılığı testinde uygulanan konsantrasyonları (12,5; 25, 50, 100, 200 µg/mL) kontrolle karşılaştırıldığında canlılık, apoptoz veya nekroz indekslerinde değişikliğe neden olmamıştır (Magnani ve diğerleri, 2009). *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen β-glukanın mutajenik, antimutajenik, genotoksik ve antigenotoksik aktivitesi farelerde intraperitoneal uygulama sonrasında alınan periferik kanda comet ve MN testleri ile değerlendirilmiştir. β-glukan (100, 150 ve 200 mg/kg vücut ağırlığı) altı hafta boyunca haftada üç ardışık gün uygulanmıştır. Siklofosfamid (SP; 50 mg/kg vücut ağırlığı) ise uygulanan gruplarda haftada bir kez verilmiştir. Birinci, beşinci ve altıncı haftada kan örnekleri alınarak testler gerçekleştirilmiştir. β-glukanın sadece en yüksek konsantrasyonunda (200 mg/kg vücut ağırlığı) genotoksik aktivitenin varlığı görülmüştür. Ayrıca SP kaynaklı genotoksik hasarı önlediği ancak artan β-glukan dozu ile antigenotoksitesite arasında korelasyon olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Antigenotoksik aktivitenin beşinci haftada azalmaya başladığı ve altıncı haftada görülmeyişi sonucuna ulaşılmıştır. Bu, β-glukanın DNA hasarını önlemedeki etkinliğinin, tedavi uzatıldığında sınırlı olduğu ve kemoterapötik ajan olarak kullanımının daha iyi açıklanması gerektiği şeklinde yorumlanmıştır (Oliveira ve diğerleri, 2013).

Mutajenlerle ön ve eş zamanlı muamelede etkili olan antimutajenlerin desmutajen, geç zamanlı muamelede etkili olanların ise biyoantimutajen olduğu bilinmektedir (De Flora ve Ramel, 1988). *Saccharomyces cerevisiae* mayasından ekstrakte edilen β-glukanın

desmutajenik ve/veya biyoantimutajenik etki mekanizmasının aydınlatılması için yapılan başka bir çalışmada MN, comet ve hücre canlılığı testleri yapılmıştır. Çalışmada Çin hamster yumurtalık hücre hatlarının yabancı tipi (CHO-K1) ve DNA onarım mekanizması eksik tipi (CHO-xrs5) kullanılmıştır. CHO-K1 hücre hattında gerçekleştirilen MN, comet ve hücre canlılığı testlerinde β -glukanın dört farklı konsantrasyonu (5, 10, 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$) tek başına ve metil metansülfonat (MMS; 37,6 ve 4,23 $\mu\text{g/mL}$) ile birlikte farklı test protokolleri ile uygulanmıştır. β -glukan klastojenik ve genotoksik etki sergilemezken, hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz indekslerinde de değişikliklere neden olmamıştır. Ayrıca test edilen tüm test protokollerinde (comet hariç) kemopreventif etki sergilemiştir. MN testinde MMS'nin neden olduğu DNA hasarını azaltan protokoller sırasıyla ön inkübasyondan sonra eş zamanlı (%42,7-56,4), ön (%35,0-57,3), basit eş zamanlı (%19,7-55,6) ve geç zamanlı (%17,9-37,6) şeklindedir. Hücre canlılığı testinde de ön inkübasyondan sonra eş zamanlı muamele, basit eş zamanlı muameleden daha etkilidir. Hücre canlılığı testinde de ön inkübasyondan sonra eş zamanlı muamele (%63,0-80,6), basit eş zamanlı muameleden (%61,6-66,5) daha etkilidir. CHO-xrs5 hücre hattında gerçekleştirilen MN ve hücre canlılığı testlerinde ise β -glukan (40 $\mu\text{g/mL}$) hem tek başına hem de MMS (18,8 $\mu\text{g/mL}$) ile birlikte farklı test protokolleri baz alınarak uygulanmıştır. β -glukan tek başına klastojenik etki göstermezken apoptozda artışa ve hücre canlılık indeksinde azalmaya neden olmuştur. β -glukan MMS'nin mutajenitesine karşı basit eş zamanlı test protokolünde kemopreventif etki (%39,7) gösterirken, geç zamanlı test protokolünde koruyucu etki (%2,96) göstermemiştir. Ayrıca basit eş zamanlı ve geç zamanlı muamelelerde apoptoz indeksinde azalmaya bağlı hücre canlılığı indeksinde artış görülmüştür. Sonuçta ön inkübasyondan sonra eş zamanlı, ön ve basit eş zamanlı uygulamalarda gözlenen antigenotoksisitenin MMS'nin etkisiz hale getirilmesi, β -glukanın MMS'ye bağlandığını ve MMS'nin kimyasal olarak etkisizleştirmesine yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca DNA replikasyonu sırasında hasarı önlemek için de etkili olduğu düşünülmektedir. Geç muamelede gösterilen antigenotoksisite ise, DNA hasarının indüklenmesinden sonra, DNA onarım mekanizmaları ile hasarın giderildiği şeklinde yorumlanmıştır. Özetle klastojenik ve antiklastojenik ajanlar arasındaki etkileşimin hücre dışı ortamda başlayabileceği ve hücre içi ortamda karşılaştıktan sonra devam edebileceğini bildirilmiştir. Bu bulgular β -glukanın desmutajen ve biyoantimutajen etki gösterdiğini, ancak desmutajen etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir (Oliveira ve diğerleri, 2007). Çalışmamızda da mutajenlerle (MMC, MMS ve H_2O_2) eş zamanlı olarak uygulanan $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin antigenotoksik etki sergilediği görülmüştür. Bu nedenle $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin

desmutajenik aktivite sergilediği, dolayısıyla mutajenlere bağlanarak onları etkisiz hale getirdiği düşünülmektedir.

Mauro ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada (2013) inülinin (50 mg/kg vücut ağırlığı, oral, 12 hafta) genotoksik ve antigenotoksik etkileri, İsviçre erkek farelerinde comet, MN ve anormal kript odağı (ACF) testleri ile değerlendirilmiştir. DNA hasarını indüklemek için 1,2 Dimetilhidrazin (DMH; 20 mg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) kullanılmıştır. Testler, ön (12 hafta inülin + 3. ve 4. hafta DMH), ön+sürekli (2 hafta inülin + 3. ve 4. hafta DMH), eş (3. ve 4. hafta inülin + DMH) ve geç zamanlı (3. ve 4. hafta DMH + son DMH'den 24 saat sonra inülin) protokolleri ile uygulanmıştır. MN testi, son muamelelerin ardından 24. (T1) ve 48. (T2) saatte, comet sadece 24. (T1) saatte gerçekleştirilmiştir. 12. haftadan sonra tüm gruplarda ACF testi uygulanmıştır. MN testi sonucunda inülinin mutajenik olmadığı ve tüm protokollerde antimutajenik aktivite sergilediği gözlenmiştir. Hasar azalma yüzdeleri T1-geç zamanlı ve T2-eş zamanlı muamele protokolleri haricindeki tüm protokollerde %100'den büyüktür. T1 ve T2 uygulamalarında hasar azalma yüzdesi azalmıştır. Bu veriler inülinin hem desmutajenik (koruma yeteneği) hem de biyo-antimutajenik (DNA onarım enzimlerinin modülasyonu yeteneği) aktivite sergilediğini ve bu aktivitelerin zamanla azaldığını düşündürmektedir. Aksine, comet sonuçlarında ise genotoksik olduğu ve antigenotoksik aktiviteden yoksun olduğu anlaşılmıştır. Ancak literatürde bu durumla ilgili tutarlı sonuca ulaşılamamıştır. Anormal kript odağı (ACF) testinde inülinin tüm protokollerde antikarsinojenik aktivitede olduğu gözlenmiştir. Yukarıdaki sonuçlar, inülinin hem desmutajenik hem de biyoantimutajenik mekanizmalar yoluyla kemopreventif etkide olduğunu ve biyoantimutajenik etkisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

MMC, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine yol açarak da oksidatif strese neden olabilmektedir. İçerdiği kinon yapısının indirgenmesi, serbest radikal olan yarı kinon veya hidrokinon ara ürünlerini oluşturmaktadır. Yarı kinon ara ürünü, aerobik koşullar altında süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) üretimine ve daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna sebep olmaktadır (Wang ve diğerleri, 2010; Klaunig ve diğerleri, 2011). Metil metansülfonat (MMS), etkisini tautomerik değişimlerle göstermektedir. Ayrıca oksidatif stres aracılığıyla da DNA hasarını indükleyebilmektedir (Siddique ve diğerleri, 2019). Hidrojen peroksit (H_2O_2), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile üretilen hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) aracılığı ile DNA hasarına neden olmaktadır. H_2O_2 , geçiş metal iyonları (tipik olarak Fe^{2+}) varlığında (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\cdot-}$) varlığında (Haber-Weiss

reaksiyonu) en güçlü radikal olan hidroksil radikaline ($\text{OH}\cdot$) dönüşmektedir (Horváthová ve diğerleri, 1998; Anderson ve diğerleri, 2003). Genel olarak, polisakkaritlerin genoprotektif etkileri antioksidan aktivite (serbest radikal temizleme, demir iyonu şelatlama), ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonunda yer alan metabolik enzimlerin inhibisyonu, DNA onarım süreçlerinin uyarılması ve hücrel metabolizmanın modülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan aktivite, en önemli antigenotoksik mekanizmalardan biridir (Aprotosoie ve diğerleri, 2019). Antioksidanlar radikal süpürücü aktivite ile serbest radikallerden elektron veya hidrojen alarak etkilerini azaltabilir. Süperoksit anyonları (O_2^-), biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilen ve hasarlara neden olabilen aktif serbest radikal öncülleri olup hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) gibi ROT üretimine neden olabilir (Pan ve diğerleri, 2010; Andrew ve Jayaraman, 2020). DPPH serbest radikali, eşlenmemiş elektronu olan bir radikaldir ve kararlı hale gelebilmesi için elektron alması gerekmektedir. Bu radikalın uzaklaştırılması, antioksidan etkinin temelini oluşturmaktadır. EPS serbest radikalleri süpürme aktivitesini, radikallerin kararlı forma indirgenmesi için elektron verebilen veya serbest radikallerle reaksiyona girebilen fonksiyonel grubunun varlığı ile gerçekleştirmektedir (Sharma ve Bhat, 2009; Dilna ve diğerleri, 2015). Antioksidanlar ayrıca, demir ve bakır gibi iyonları doğrudan temizlemek yerine onları şelatlayarak da serbest radikal oluşumunu inhibe edebilir (Wang ve diğerleri, 2016). Birçok raporda farklı probiyotiklerden elde edilen EPS'lerin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda serbest radikal temizleme ve metal şelatlama aktiviteeleri sergilediği gösterilmiştir. Ancak EPS'ler, yapı ve fizikokimyasal özellikler açısından oldukça çeşitlidir. Ayrıca EPS üretimi pH, sıcaklık ve O_2 gibi koşullardan etkilenir. Bu nedenler EPS'lerin antioksidan mekanizmalarının tam olarak açıklamasını zorlaştırmaktadır (Feng ve Wang, 2020). Çeşitli çalışmalarda da EPS'lerin antikanser, antigenotoksik, antiinflamatuvar ve antiülser gibi özellikleri, antioksidan özellikleriyle ilişkilendirilmiştir (Miranda ve diğerleri, 2008; Wu ve diğerleri, 2011; Nampoothiri ve diğerleri, 2017). Antioksidanların MMC, MMS ve H_2O_2 kaynaklı genotoksositeye karşı etkili oldukları da çeşitli çalışmalar ile raporlanmıştır (Figat ve diğerleri, 2020; Sassi ve diğerleri, 2021). Demir şelatlama ve serbest radikal süpürücü aktivitelerin özellikle Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarını engelleyerek oksidatif stres kaynaklı DNA hasarını önlemede önemli olduğu bildirilmiştir (Finefrock ve diğerleri, 2003; Habtemariam, 2007; Vega-Hernández ve diğerleri, 2017).

Çalışmada $\text{EPS}_{\text{KC27L}}$ 'nin incelenen konsantrasyonlarının DNA hasarını indüklediği, MMC, MMS ve H_2O_2 mutajenlerinin neden oldukları hasarları da anlamlı ölçüde azalttığı

gözlenmiştir. Bu nedenle EPS_{KC27L}'nin antimutajen aktivite sergilediği söylenebilir. Bu aktiviteyi de güçlü antioksidan kapasitesi ile sağlamış olabileceği düşünülmektedir. EPS_{KC27L}, antioksidan özelliğini DPPH radikalini giderme etkisi, demir iyonu (Fe⁺²) şelatlama aktivitesi ve süperoksit anyon radikali (O₂⁻) süpürücü aktivitesi ile göstermektedir. 1 mg/mL EPS_{KC27L} ve inülinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında benzer DPPH radikalini giderme ve demir iyonu (Fe⁺²) şelatlama aktivitesi bulunmaktadır. Ayrıca EPS_{KC27L}'nin, inüline kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla süperoksit anyon radikalini (O₂⁻) süpürücü aktivitesi de bulunmaktadır. Antioksidan çalışmalarında denenen her üç yöntemde de 0,5 mg/mL inülinin antioksidan aktivitesinin olmadığı görülmüştür. 0,5 mg/mL EPS_{KC27L}'lerin ise antioksidan aktiviteye sahip olması avantaj olarak düşünülmektedir (Çelik, 2018).

Antimutajenik bileşikler tanımlamak ve eylemlerinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmak için, bu bileşiklerin farklı muamele protokolleri kullanılarak test edilmesi gerekmektedir (Mauro ve diğerleri, 2013). Yaygın olarak kullanılan protokoller ön muamele, eş zamanlı muamele ve geç muameledir. Ön muamelede maddenin genotoksik hasarı önleme yeteneği değerlendirilmektedir. Bu nedenle test edilen madde mutajenden önce uygulanmaktadır. Eş zamanlı muamelede, test edilen bileşik ile mutajen ortama aynı anda uygulanmaktadır. Böylece maddenin hücre dışındaki mutajene müdahale etme kapasitesi değerlendirilmektedir. Geç muamelede ise mutajen kaynaklı hasarı onarma kapasitesinin incelenmesi için test maddesi, mutajenden sonra verilmektedir (Di Sotto ve diğerleri, 2010). Mutajenlerle ön veya eş zamanlı muamelede etkili olan antimutajenlerin desmutajen, geç zamanlı muamelede etkili olanların ise biyoantimutajen olduğu bilinmektedir (De Flora ve Ramel, 1988; Kaur ve Saini, 2000). Desmutajenler doğrudan mutajenler veya bunların öncülerini inaktive ederken, biyoantimutajenler DNA tamir ve replikasyon mekanizmalarına etki ederek hasarı azaltmaktadır. Birçok antimutajen ve antikarsinojen, birden fazla etki mekanizmasına sahiptir (Ferguson 1994). Desmutajenik etki, genotoksik ajanların kimyasal veya enzimatik inaktivasyonu, promutajenlerin metabolik aktivasyonunun inhibe edilmesi veya serbest radikallerin temizlenmesi ile karakterize edilmektedir (Kada ve diğerleri, 1986; Wang ve diğerleri, 2002; Dias ve diğerleri, 2009; Melo ve diğerleri, 2016).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar EPS_{KC27L}'nin genotoksik olmadığı ve MMC, MMS ve H₂O₂ mutajenlerine karşı antigenotoksik olduğunu göstermektedir. EPS_{KC27L}'nin antioksidan aktiviteler sergileyerek, özellikle Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarını

engelleyerek oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı etkili bir koruma sağladığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle EPS_{KC27L}'nin MMC, MMS ve H₂O₂ veya onların metabolik ürünleri ile doğrudan etkileşimleri mümkün olmakla birlikte bu etkileşimler desmutajenik aktivite ile sağlanmış olabilir. Bununla birlikte EPS_{KC27L}'nin eş zamanlı muamelede antigenotoksik etki sergilemiş olması da onun desmutajenik aktivitesi hakkındaki hipotezimizi desteklemektedir.

Çoğu EPS'nin hem doğrudan mutajenlere bağlanarak onları inaktive edebilen desmutajenik aktivite hem de DNA tamir mekanizmaları, apoptoz, hücre döngüsü genlerine etki edebilen biyoantimutajenik aktivitede olduğu bilinmektedir. EPS'lerin toksin bağlayıcı olarak hareket ederek toksinlerin ökaryotik hücrelerle etkileşimini önlediği de raporlanmıştır. Ayrıca laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş sütte izole edilen EPS'nin, cildi UV hasarına karşı korumak için DNA onarım mekanizmalarını uyardığı da bilinmektedir. Bu nedenle EPS_{KC27L}'nin desmutajenik aktivitenin yanı sıra biyoantimutajenik aktivite de sergileyebileceği düşünülmektedir. Ancak tam olarak hangi mekanizmalar aracılığıyla antigenotoksik etki sergilediği bilinmemektedir. Bu mekanizmaların anlaşılması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genotoksik ajanlar ve serbest radikaller, kanser dahil çeşitli hastalıkların başlatılmasında ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu ajanların mutajenik ve kanserojenik etkilerine engel olmak için yeni biyoaktif bileşiklerin araştırılması oldukça önemlidir. Antimutajenler, mutajenlerin etkilerini azaltabilir ve/veya önleyebilir. Harici antioksidan kaynakların uygulanması da oksidatif stresle başa çıkmada yardımcı olabilir. Mevcut kanıtlar, antioksidan aktivitenin oldukça önemli ve aranan bir özellik olduğunu göstermektedir. Çünkü antioksidan özellikteki bileşiklerin, bu mekanizmalarla antimutajenik aktivite sergiledikleri bilinmektedir. Bu yüzden de antioksidan olan maddelerin antimutajenik potansiyellerinin araştırılması oldukça önemlidir. Son yıllarda antioksidan aktiviteye sahip, toksik olmayan doğal antimutajenlerin arayışına yoğunlaşılmıştır.

Son zamanlarda, antioksidan özellikler de dahil olmak üzere çeşitli terapötik aktiviteleri nedeniyle mikrobiyal EPS'ler ilgi görmektedir. Prebiyotik, antioksidan, antikanser, immünomodülatör, antiviral, antibiyofilm ve kan kolesterol düşürücü gibi sağlıkla ilişkili etkiler göz önüne alındığında, mevcut ve yeni mikrobiyal ekzopolisakkaritlerin araştırılması son derece önem arz etmektedir. Sağlık açısından etkileri, çeşitliliği ve işlevleri düşünüldüğünde mikrobiyal EPS'lerin mutasyona bağlı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılması uygun görünmektedir. EPS'lerin gıda (kıvam arttırıcı, emülgatör, jelleştirici), sağlık (ilaç taşıyıcı, aşı üretimi, protez), tekstil (boya, akıllı kumaş), tarım (kirli toprağın temizlenmesi, patojenlerin ortadan kaldırılması), petrol (yağ geri kazanımı) ve kozmetik (koku taşıyıcı) endüstrilerinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca modifikasyon yöntemleriyle çeşitli özelliklerin kazandırılması ve uygulama alanlarının genişletilmesi de mümkündür. Daha çevre dostu ürün ve teknolojiye duyulan istek her geçen gün artmaktadır. Böylelikle yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyomoleküllerin kullanımı da şüphesiz ki gelecekte artacaktır. EPS'lerin, fonksiyonel gıda, sağlık ve endüstri alanlarındaki giderek artan kullanımları nedeniyle genotoksik etkilerinin ve potansiyel antigenotoksisite mekanizmalarının araştırılması gerekmektedir.

LAB'lar ve LAB'lardan elde edilen EPS'ler güvenli (GRAS) olarak tanımlanmaktadır. Bir LAB olan *L. salivarius*, son yıllarda ümit verici bir probiyotik tür olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada *L. salivarius* bakterisinden izole edilen EPS_{KC27L}'nin genotoksisitesi ve antigenotoksisitesi ilk kez araştırılmıştır. Genotoksik etkilere neden olmayan bu EPS'nin

aynı zamanda MMC, MMS ve H₂O₂ mutajenleri tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı kemopreventif aktivite sergilediği saptanmıştır. Antigenotoksik etkilerini hem desmutajenik aktivite hem de biyoantimutajenik aktivite ile sergilediği ve bu etkisini, sahip olduğu güçlü antioksidan özellikler ile sağladığı düşünülmektedir. Bu sonucun desteklenmesi için ön ve geç zamanlı uygulamaların da yapılması gerekmektedir. Ayrıca tam mekanizmasının anlaşılması için *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanacak farklı testlere de ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- AbdelHakem, A. M. and Abdelhafez, E. S. M. (2020). Current trends and future perspectives of antimutagenic agents. In Soloneski, S.L. and Larramendy, M. (Eds.), *In Genotoxicity and Mutagenicity-Mechanisms and Test Methods*, IntechOpen, pp. 1-3.
- Abdelnasser, S. M., Yahya, S. M. M., Mohamed, W. F., Gadallah, M. A., Shady, H. M. A., Mahmoud, M. G. and Asker, M. M. S. (2020). Human apoptosis antibody array-membranes studying the apoptotic effect of marine bacterial exopolysaccharides in HepG2 cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 38-45.
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attiaa, H. and Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728.
- Adebayo-Tayo, B. C. and Popoola, A. O. (2017). Biogenic synthesis and antimicrobial activity of Silver nanoparticle using exopolysaccharides from Lactic Acid bacteria. *International Journal of Nano Dimension*, 8(1), 61-69.
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I. and Jeyaram, K. (2018). Production, characterization and *in vitro* antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. *LWT*, 87, 432-442.
- Ahmed, S. A. and Hidayat, H. J. (2020). Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident of female breast cancer patients in Iraq. *Annals of Tropical Medicine and Health*, 23, 1-13.
- Al-Dulaimi, D. W., Shah Abdul Majid, A., M. Baharetha, H., Ahamed, M. B. K., Faisal, S. F., Al Zarzour, R. H., Ein Oon, C., Shah Abdul Majid, A. M. and Ahmed Hassan, L. E. (2020). Anticlastogenic, antimutagenic, and cytoprotective properties of Orthosiphon stamineus ethanolic leaves extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 13, 1-10.
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A. and Binetti, A. G. (2020). *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties. *Food Microbiology*, 90, 103465.
- Altun, İ. (2018). Exopolysaccharides in milk and dairy products as a functional component. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/Journal of the Institute of Natural & Applied Sciences*, 23(1), 115-122.
- Altunbek, M., Çetin, D., Suludere, Z. and Çulha, M. (2019). Surface-enhanced Raman spectroscopy based 3D spheroid culture for drug discovery studies. *Talanta*, 191, 390-399.
- Ambalam, P., Raman, M., Purama, R. K. and Doble, M. (2016). Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 119-131.

- Anderson, D., Schmid, T. E., Baumgartner, A., Cemeli-Carratala, E., Brinkworth, M. H. and Wood, J. M. (2003). Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2-3), 173-178.
- Andrew, M. and Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 487, 107881.
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, V. S., Trifan, A. and Miron, A. (2019). Antigenotoxic potential of some dietary non-phenolic phytochemicals. *In Studies in Natural Products Chemistry*, 60, 223-297.
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., Carvalho, R. F., Souzac, E. B. and de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- Asmat, U., Abad, K. and Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553.
- Augustyniak, M., Gladysz, M. and Dziewiğcka, M. (2016). The comet assay in insects-Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 67-76.
- Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., Özçelik, A. B., Ersan, S. and Ünal, F. (2017). Evaluation of genotoxic effects of 3-methyl-5-(4-carboxycyclohexylmethyl)-tetrahydro-2H-1, 3, 5-thiadiazine-2-thione on human peripheral lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1228-1233.
- Azab, M., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., Hawamdeh, H., Quttina, M. and Nassar, L. (2017). Assessment of genotoxicity of pyrethrin in cultured human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(3), 251-255.
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Badel, S., Laroche, C., Gardarin, C., Bernardi, T. and Michaud, P. (2008). New method showing the influence of matrix components in *Leuconostoc mesenteroides* biofilm formation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 364-370.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S. C., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Jeongheui Lim, J. and Park, Y. H. (2016). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(1), 1-23.
- Barcelos, M. C., Vespermann, K. A., Pelissari, F. M. and Molina, G. (2019). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475-1495.
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C. and Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213-1224.

- Bausinger, J. and Speit, G. (2016). The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay. *Mutagenesis*, 31(5), 567-572.
- Behare, P. and Kumar, S. (2019). Exopolysaccharides Producing Lactic Acid Cultures for Indigenous Fermented Milk Products. *Journal of AgriSearch*, 6(Special), 142-145.
- Benhusein, G. M., Mutch, E., Aburawi, S. and Williams, F. M. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, 5(1), 1-6.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(1), 11-30.
- Berthold-Pluta, A. M., Pluta, A. S., Garbowska, M. and Stasiak-Róžańska, L. (2019). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria-health-promoting properties and application in the dairy industry. *Advancements of Microbiology*, 58, 191-204.
- Bhaskaracharya, R. K. and Shah, N. P. (2000). Texture characteristics and microstructure of skim milk mozzarella cheeses made using exopolysaccharide or non-exopolysaccharide producing starter cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 132.
- Bhattacharya, S. (2011). Natural antimutagens: A review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(2), 116-126.
- Blomme, E. A. and Will, Y. (2016). Toxicology strategies for drug discovery: Present and future. *Chemical Research in Toxicology*, 29(4), 473-504.
- Bodell, W. J. (1990). Molecular dosimetry for sister-chromatid exchange induction and cytotoxicity by monofunctional and bifunctional alkylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 233(1-2), 203-210.
- Bolognesi, C., Bonassi, S., Knasmueller, S., Fenech, M., Bruzzone, M., Lando, C. and Ceppi, M. (2015). Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 20-31.
- Brüsehäfer, K., Rees, B. J., Manshian, B. B., Doherty, A. T., O'Donovan, M. R., Doak, S. H. and Jenkins, G. J. S. (2014). Chromosome breakage induced by the genotoxic agents mitomycin C and cytosine arabinoside is concentration and p53 dependent. *Toxicological Sciences*, 140(1), 94-102.
- Burlinson, B. (2012). The *in vitro* and *in vivo* comet assays. In Parry, J. M., Parry, E. M. (Eds.), *In Genetic Toxicology*, Springer, pp. 143-163.
- Busing, W. R. and Levy, H. A. (1965). Crystal and molecular structure of hydrogen peroxide: a neutron-diffraction study. *The Journal of Chemical Physics*, 42(9), 3054-3059.

- Bzeouich, I. M., Mustapha, N., Maatouk, M., Ghedira, K., Ghoul, M. and Chekir-Ghedira, L. (2016). Genotoxic and anti-genotoxic effects of esculin and its oligomer fractions against mitomycin C-induced DNA damages in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 82, 48-52.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. and Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877-3886.
- Calini, V., Urani, C. and Camatini, M. (2002). Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 18(6), 369-379.
- Cao, J., Zhang, J., Wang, Y., Du, L. Q., Xu, C., Wang, Q., Liu, J. X., Su, X., Fan, F. Y., Liu, Q. and Fan, S. J. (2013). Cytogenetic abnormalities in lymphocytes from victims exposed to cobalt-60 radiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17525-17535.
- Carocho, M. and Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cartus, A. and Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 574-582.
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P. (2018). Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.
- Cavalcanti, B. C., Neto, J. B. D. A., Silva, A. A. D. S., Barreto, F. S., Ferreira, J. R. D. O., Magalhães, H. I. F., da Silva, C. R., Vieira, I. G. P., Ricardo, N. M. P. S., Júnior, H. V. N. and Moraes, M. O. (2021). Chemopreventive effect of troxerutin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human leukocytes through modulation of glutathione-dependent enzymes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(4), 137-151.
- Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C. and Brown, G. W. (2002). A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16934–16939.
- Chatterjee, N. and Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Chaves, B. D., Brashears, M. M. and Nightingale, K. K. (2017). Applications and safety considerations of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in animal and human health. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 18-28.
- Chen, F. and Huang, G. (2018). Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 211-216.

- Chen, Z., Xing, T., Li, J., Zhang, L., Jiang, Y. and Gao, F. (2021). Hydrogen peroxide-induced oxidative stress impairs redox status and damages aerobic metabolism of breast muscle in broilers. *Poultry Science*, 100(2), 918-925.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. and Kim, S. H. (2006). Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 452-458.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P. and Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: The emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192-1206.
- Cordelli, E., Bignami, M. and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1) 68-78.
- Corvi, R. and Madia, F. (2017). *In vitro* genotoxicity testing - Can the performance be enhanced. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 600-608.
- Çelik, K. (2018). *Tavuk Dışkısından İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri Ekzopolisakkaritlerinin Antioksidan ve Antibiyofilm Aktiviteleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- De Flora, S. and Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 8-15.
- De Flora, S. and Ramel, C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 202(2), 285-306.
- de Souza, L. M., de Sousa, F. D., Cruz, R. C. R., Tavares, D. C. and Francielli de Oliveira, P. (2020). Hypericin, a medicinal compound from St. John's Wort, inhibits genotoxicity induced by mutagenic agents in V79 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-6.
- Demirci, A. S., Palabiyik, I., Altan, D. D., Apaydın, D. and Gumus, T. (2017). Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 18-23.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M. and Relman, D. A. (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9), 517-523.
- Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P. and Maffei, F. (2010). Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 699(1-2), 23-28.
- Dias, C. D., Araújo, B. C., Dutra, E. S. and Nepomuceno, J. C. (2009). Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research* 8(4), 1367-1375.

- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A. and Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Dos Santos, L. F., De Melo, F. B. C., Paiva, W. M., Borsato, D., Da Silva, M. C. C. and Celligoi, M. P. C. (2013). Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(4), 8413-8422.
- Drago, L., De Vecchi, E., Gabrieli, A., De Grandi, R. and Toscano, M. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 and *Bifidobacterium breve* BR03, alone and in combination, on peripheral blood mononuclear cells of allergic asthmatics. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 7(4), 409-413
- EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9(9), 2379.
- Eke, D. and Celik, A. (2008). Genotoxicity of thimerosal in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation sister chromatid exchange analysis proliferation index and mitotic index. *Toxicology In Vitro*, 22(4), 927-934.
- Erikel, E., Yuzbasioglu, D. and Unal, F. (2019). *In vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal Of Ethnopharmacology*, 237, 171-181.
- Escárcega-González, C. E., Garza-Cervantes, J. A., Vázquez-Rodríguez, A., and Morones-Ramírez, J. R. (2018). Bacterial exopolysaccharides as reducing and/or stabilizing agents during synthesis of metal nanoparticles with biomedical applications. *International Journal of Polymer Science*, 7045852
- Evans, H. J., Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. (Second edition), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam, Elsevier Sciences, 405–428.
- Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 58-66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- Feng, T. and Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review. *Gut Microbes*, 12(1), 1801944.

- Ferguson, L. R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 395-410.
- Fernandes Veloso Borges, F., Ribeiro E Silva, C., Moreira Goes, W., Ribeiro Godoy, F., Craveiro Franco, F., Hollanda Vêras, J., Luiz Cardoso Bailão, E. F., De Melo E Silva, D., Gomes Cardoso, C., Divino Da Cruz, A. and Chen-Chen, L. (2018). Protective effects of silymarin and silibinin against DNA damage in human blood cells. *BioMed Research International*, 2,1-8.
- Figat, R., Śliwińska, A., Stochmal, A., Soluch, A., Sobczak, M., Zgadzaj, A., Sykłowska-Baranek, K. and Pietrosiuk, A. (2020). Antigenotoxic, Anti-photogenotoxic, and Antioxidant Properties of *Polyscias filicifolia* Shoots Cultivated In Vitro. *Molecules*, 25(5), 1090.
- Finefrock, A. E., Bush, A. I. and Doraiswamy, P. M. (2003). Current status of metals as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(8), 1143-1148.
- Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., Pinheiro, T. G., Souza, T. S. and Pedro-Escher, J. (2010). Microscopy as a tool in toxicological evaluations. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 2, 1001-1007.
- Franke, S. I. R., Prá, D., da Silva, J., Erdtmann, B. and Henriques, J. A. P. (2005b). Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(1), 75-84.
- Franke, S. I. R., Prá, D., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. and da Silva, J. (2005a). Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: An *in vivo* analysis. *Mutagenesis*, 20(4), 279-283.
- Franzke, B., Schwingshackl, L. and Wagner, K. H. (2020). Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity-A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 108343.
- Fu, D., Calvo, J. A. and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104-120.
- Geetha, S. J., Banat, I. M. and Joshi, S. J. (2018). Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 23-32.
- German, J. and Alhadeff, B. (1994). Analysis of sister-chromatid exchanges. *Current Protocols in Human Genetics*, 2(1), 8-6.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T. and de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6(3), 209-240.

- Ghebretinsae, A. H., Faes, C., Molenberghs, G., De Boeck, M. and Geys, H. (2013). A Bayesian, generalized frailty model for comet assays. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 23(3), 618-636.
- Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J. and Ghosh, S. (2020). Intestinal barrier function and metabolic/liver diseases. *Liver Research*, 4(2), 81-87
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Kristin Verbeke, K. and Reid, G. (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491.
- Gichner, T. (2003). DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco: Cellular and acellular comet assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535(2), 187-193.
- Glei, M., Schneider, T. and Schlörmann, W. (2016). Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology*, 90(10), 2315-2336.
- Grajek, W., Olejnik, A. and Sip, A. (2005). Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 665-671.
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G. and Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 93-118.
- Grandjean, P. (2016). Paracelsus revisited: The dose concept in a complex world. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(2), 126-132.
- Greiner, A. K., Papineni, R. V. and Umar, S. (2014). Chemoprevention in gastrointestinal physiology and disease. Natural products and microbiome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(1), 1-15.
- Guarner, F. and Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Guideline, I. H. T. (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). In International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, *ICH Expert Working Group*, 4, 1-25.
- Guilherme, R. S., Meloni, V. F. A., Kim, C. A., Pellegrino, R., Takeno, S. S., Spinner, N. B., Conlin, L. K., Christofolini, D. M., Leslie D Kulikowski, L. D. and Melaragno, M. I. (2011). Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Medical Genetics*, 12(1), 1-7.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gutierrez, R. and O'Connor, T. R. (2021). DNA direct reversal repair and alkylating agent drug resistance. *Cancer Drug Resistance*, 4, 414-423.

- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D. and Clement, M. V. (2014). OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457-465.
- Habas, K., Najafzadeh, M., Baumgartner, A., Brinkworth, M. H. and Anderson, D. (2017). An evaluation of DNA damage in human lymphocytes and sperm exposed to methyl methanesulfonate involving the regulation pathways associated with apoptosis. *Chemosphere*, 185, 709-716.
- Habtemariam, S. (2007). Antioxidant activity of knipholone anthrone. *Food Chemistry*, 102(4), 1042-1047.
- Hanson, R. N., Hua, E., Labaree, D., Hochberg, R. B., Proffitt, K., Essigmann, J. M. and Croy, R. G. (2012). Convergent synthesis of a steroidal antiestrogen-mitomycin C hybrid using “click” chemistry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(42), 8501-8508.
- Harris, H. M., Bourin, M. J., Claesson, M. J. and O'Toole, P. W. (2017). Phylogenomics and comparative genomics of *Lactobacillus salivarius*, a mammalian gut commensal. *Microbial Genomics*, 3(8).
- Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H-J., Monien, B., Rietjens, I. M. C. M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P. and Eisenbrand, G. (2020). Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of toxicology*, 94(6), 1787-1877.
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(1), 18.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. and Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506.
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J. and Stopper, H. (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 85-98.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. and Rastall, R. A. (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T. and Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283-307.
- Horváthová, E., Slameňová, D., Hlinčíková, L., Mandal, T. K., Gábelová, A. and Collins, A. R. (1998) The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research/DNA Repair*, 409(3), 163-171.

- Hosseinzadeh, H. and Sadeghnia, H. R. (2007). Effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (Saffron), on methyl methanesulfonate (MMS) - Induced DNA damage in mouse organs: An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *DNA and Cell Biology*, 26(12), 841–846.
- Hovhannisyan, G. G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*, 3(1), 17.
- Huang, Q., Liu, H., Suzuki, K., Ma, S. and Liu, C. (2019). Linking what we eat to our mood: A review of diet, dietary antioxidants, and depression. *Antioxidants*, 8(9), 376.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R. and Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.
- Ionescu, M. E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A. G., Gologan, S. I., Arbanas, T., and Diculescu, M. M. (2011). Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *Maedica*, 6(3), 173.
- Ismail, B. and Nampoothiri, K. (2013). Exposition of antitumour activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Biologia*, 68(6), 1041-1047.
- Iwamoto, T., Suzuki, N., Tanabe, K., Takeshita, T. and Hirofuji, T. (2010). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 110(2), 201-208.
- Izquierdo-Vega, JA., Morales-González, JA., SánchezGutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S., Sumaya-Martínez, MT., Morales-González, A., Paniagua-Pérez, R. and Madrigal-Bujaidar, E. (2017). Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients*, 9(2); 102.
- Jagetia, G. C. (2021). Antioxidant activity of curcumin protects against the radiation-induced micronuclei formation in cultured human peripheral blood lymphocytes exposed to various doses of γ -Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 1-16.
- Jain, A. K. and Andsorbhoy, R. K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. *Cytologia*, 53, 427-436.
- Jenkins, G. J. S., Doak, S. H., Johnson, G. E., Quick, E., Waters, E. M. and Parry, J. M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents. *Mutagenesis*, 20(6), 389-398.
- Jiang, M. C., Liang, H. J., Liao, C. F. and Lu, F. J. (1999). Methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide differentially regulate p53 accumulation in hepatoblastoma cells. *Toxicology Letters*, 106(2-3), 201-208.
- John, O. D., Du Preez, R., Panchal, S. K. and Brown, L. (2020). Tropical foods as functional foods for metabolic syndrome. *Food & Function*, 11(8), 6946-6960.

- Kada, T., Inoue, T., Ohta, T. and Shirasu, Y. (1986). Antimutagens and their modes of action. In Shankel, D.M., Hartman, P. E., Kada, T. and Hollaender, A. (Eds.), *In Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, New York: Plenum, pp. 181-196.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K. and Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International*, 10, 1155-1166.
- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K. and Seo, Y. R. (2013). Recent advances in *in vivo* genotoxicity testing: Prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 277.
- Karlsson, H. L. (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 651-666.
- Karlsson, H. L., Di Bucchianico, S., Collins, A. R. and Dusinska, M. (2015). Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2), 82-96.
- Kaur, I. P. and Saini, A. (2000). Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 470(1), 71-76.
- Kelloff, G. J., Sigman, C. C. and Greenwald, P. (1999). Cancer chemoprevention: progress and promise. *European Journal of Cancer*, 35(14), 2031-2038.
- Kerche-Silva, L. E., Cólus, I. M., Malini, M., Mori, M. P., Dekker, R. F. and Barbosa-Dekker, A. M. (2017). *In vitro* protective effects of botryosphaeran, a (1→3; 1→6)- β -D-glucan, against mutagens in normal and tumor rodent cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 814, 29-36.
- Khan, M.A. Jyoti, S., Rahul, Naz, F., Ara, G., Afzal, M. and Siddique, Y. H. (2019). Effect of lemon grass extract against methyl methanesulfonate-induced toxicity. *Toxin Reviews*, 1-15.
- Kharma, M. Y., Koussa, B., Dadoue, M., Daboul, M., Hasan, R., Daboul, R. and Muhsin, M. (2020). Prevention of oral cancer by natural products. *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research*, 7(3), 72.
- Kimoto, T., Shibuya, T. and Shiobara, S. (1997). Safety studies of a novel starch, pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 323-329.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Annelies Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163.

- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M. and Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 137-148.
- Kitanovic, A., Walther, T., Loret, M. O., Holzwarth, J., Kitanovic, I., Bonowski, F., Bui, N. V., Jean Marie Francois, J. M. and Wölfl, S. (2009). Metabolic response to MMS-mediated DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the glucose concentration in the medium. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 535-551.
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X. and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(2), 86-99.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K. and Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids*, 543531.
- Krishna, G. and Hayashi, M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166.
- Kumar, V., Ara, G., Afzal, M. and Siddique, Y. (2011). Effect of methyl methanesulfonate on hsp70 expression and tissue damage in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 159-165.
- Lackinger, D., Eichhorn, U., and Kaina, B. (2001). Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. *Mutagenesis*, 16 (3), 233-241.
- Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P. and Kitazawa, H. (2016). Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells. *Microorganisms*, 4(3), 27.
- Langie, S. A., Azqueta, A. and Collins, A. R. (2015). The comet assay: past, present, and future. *Frontiers in Genetics*, 6, 266.
- Langman, L. J. and Kapur, B. M. (2006). Toxicology: Then and now. *Clinical Biochemistry*, 39(5), 498-510.
- Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., De Giori, G. S., Sesma, F., Van Sinderen, D. and Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160-168.
- Lee, J. Y., Han, G. G., Kim, E. B. and Choi, Y. J. (2017). Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation. *Microbiological Research*, 205, 48-58.

- Lee, M. Y., Kim, M. A., Kim, H. J., Bae, Y. S., Park, J. I., Kwak, J. Y., Chung, H. H. and Yun, J. (2007). Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: Implications in cancer cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 483-489.
- Lee-Sarwar, K. A., Lasky-Su, J., Kelly, R. S., Litonjua, A. A. and Weiss, S. T. (2020). Metabolome–Microbiome Crosstalk and Human Disease. *Metabolites*, 10(5), 181.
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Lu, L., Guan, J, Zhang, D. and Lin, Y. (2016). Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237-250.
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X. and Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.
- Li, Y., Canchaya, C., Fang, F., Raftis, E., Ryan, K. A., van Pijkeren, J. P., van Sinderen, D. and O'Toole, P. W. (2007). Distribution of megaplasms in *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 189(17), 6128-6139.
- Liu, C. T., Chu, F. J., Chou, C. C. and Yu, R. C. (2011). Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(2), 157-162.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- López-Romero, D., Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Sánchez-Gutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Alvarez-Gonzalez, I. Morales-González, A. and Madrigal-Santillán, E. (2018). Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: Plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*, 10(12), 1954.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. and Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3799-3811.
- Lv, L. X., Hu, X. J., Qian, G. R., Zhang, H., Lu, H. F., Zheng, B. W., Jiang, L. and Li, L. J. (2014). Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5619-5632.
- Lynch, K. M., Coffey, A. and Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110, 52-61.
- Madrigal-Bujaidar, E., Barriga, S. D., Cassani, M., Marquez, P. and Revuelta, P. (1998). *In vivo* and *in vitro* antigenotoxic effect of nordihydroguaiaretic acid against SCEs induced by methyl methanesulfonate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 419(1-3), 163-168.

- Magnani, M., Calliari, C. M., de Macedo Jr, F. C., Mori, M. P., de Syllos Cólus, I. M. and Castro-Gomez, R. J. (2009). Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 658-665.
- Magnani, M., Calliari, C. M., de Macedo Jr, F. C., Mori, M. P., de Syllos Cólus, I. M. and Castro-Gomez, R. J. (2009). Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 658-665.
- Majee, S. B., Avlani, D. and Biswas, G. R. (2017). Rheological behavior and pharmaceutical applications of bacterial exopolysaccharides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7, 224-232.
- Majumder, A. and Goyal, A. (2009). Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Food Research International*, 42(4), 525-528.
- Malini, M., Camargo, M. S., Hernandez, L. C., Vargas-Rechia, C. G., Varanda, E. A., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Matsumoto, S. T., Antunes, L. M. G. and Cólus, I. M. S. (2016). Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. *Toxicology In Vitro*, 36, 18-25.
- Mateuca, R. A., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2012). Cytogenetic methods in human biomonitoring: Principles and uses. In Parry, J. M. and Parry, E. M. (Eds.), *Genetic Toxicology*, Springer, pp. 305-333.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
- Mauro, M. O., Monreal, M. T. F. D., Silva, M., Pesarini, J. R., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Dichi, J. B., Carreira, C. M. and Oliveira, R. J. (2013). Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin *in vivo*. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2281-2293.
- Mello, M. B., Machado, C. S., Ribeiro, D. L., Aissa, A. F., Burim, R. V., Alves da Cunha, M. A., Barcelos, G. R. M., Antunes, L. M. G. and Bianchi, M. L. P. (2017). Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. *Toxicology*, 376, 66-74.
- Melo, B. A. G., Motta, F. L. and Santana, M. H. A. (2016). Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering*, 62, 967-974.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J. M. and Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296-304.

- Miranda, C. C., Dekker, R. F., Serpeloni, J. M., Fonseca, E. A., Cólus, I. M. and Barbosa, A. M. (2008). Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 172-177.
- Moles, L., Escribano, E., de Andrés, J., Montes, M. T., Rodríguez, J. M., Jiménez, E., de Pipaón, M. S. and Espinosa-Martos, I. (2015). Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *Journal of immunology Research*. 38171
- Møller, P., Stopper, H. and Collins, A. R. (2020). Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis*, 35(1), 5-18.
- Morifuji, M., Kitade, M., Fukasawa, T., Yamaji, T. and Ichihashi, M. (2017). Exopolysaccharides isolated from milk fermented with lactic acid bacteria prevent ultraviolet-induced skin damage in hairless mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 146.
- Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1012.
- Mosesso, P., Cinelli, S., Natarajan, A. T. and Palitti, F. (2016). *In vitro* cytogenetic assays: Chromosomal aberrations and micronucleus tests. In Dhawan, A. and Bajpayee, M. (Eds.). *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*, Springer Science+Business Media New York, pp. 123-146.
- Mourelatos, D. (2016). Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 803, 1-12.
- Murphy, E. C. and Friedman, A. J. (2019). Hydrogen peroxide and cutaneous biology: Translational applications, benefits, and risks. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(6), 1379-1386.
- Nampoothiri, K. M., Beena, D. J., Vasanthakumari, D. S. and Ismail, B. (2017). Health benefits of exopolysaccharides in fermented foods. In Martinez-Villaluenga C. and Peñas E. (Eds.), *In Fermented foods in health and disease prevention*. Academic Press. pp. 49-62.
- Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3-16.
- Neville, B. A. and O'Toole, P. W. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. *Future Microbiology*, 5(5), 759-774.
- Nissen, L., Sgorbati, B., Biavati, B. and Belibasakis, G. N. (2014). *Lactobacillus salivarius* and *L. gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression. *Annals of Microbiology*, 64(2), 611-617.

- Nowell, P. C. (1964). Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. *Experimental Cell Research*, 33(3), 445-449.
- Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Oerlemans, M. M., Akkerman, R., Ferrari, M., Walvoort, M. T. and de Vos, P. (2020). Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. *Journal of Functional Foods*, 104289.
- Ohta, T. (1993). Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(2), 127-146.
- Okello, R. C. O., de Visser, P. H. B., Heuvelink, E., Marcelis, L. F. M. and Struik, P. C. (2016). Light mediated regulation of cell division, endoreduplication and cell expansion. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 39–47.
- Oliveira, R. J., Matuo, R., Da Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S. and Ribeiro, L. R. (2007). Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology In Vitro*, 21(1), 41-52.
- Oliveira, R. J., Salles, M. J. S., Silva, A. F. D., Kanno, T. Y. N., Lourenço, A. C. D. S., Leite, V. D. S., Matiazi, H., J., Pesarini, J. R. Ribeiro, L. R. and Mantovani, M. S. (2013). *In vivo* evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 413-424.
- Ostling, O., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T. and Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), 19-28.
- Pan, D. and Mei, X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 908-914.
- Patel, A. and Prajapat, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1(2), 1-8.
- Patel, A. K., Michaud, P., Singhanian, R. R., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2010). Polysaccharides from probiotics: new developments as food additives. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 451-463.
- Patten, D. A., Leivers, S., Chadha, M. J., Maqsood, M., Humphreys, P. N., Laws, A. P. and Collett, A. (2014). The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. *rosyjski* and *Lactobacillus acidophilus* sp. *5e2*. *Carbohydrate Research*, 384, 119-127.

- Pawar, A. A., Vikram, A., Tripathi, D. N., Padmanabhan, S., Ramarao, P. and Jena, G. (2009). Modulation of mitomycin C-induced genotoxicity by acetyl- and thio-analogues of salicylic acid. *In Vivo*, 23(2), 303-307.
- Perry, P. and Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen–carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531), 121-125.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251(5471), 156-158.
- Phillips, D. H. and Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: Damage to DNA and its consequences. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 87-110.
- Pinto, B., Caciagli, F., Riccio, E., Reali, D., Šarić, A., Balog, T., Likić, S. and Scarpato, R. (2010). Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 4122-4128.
- Pinto, F. C. M., De-Oliveira, A. C. A., De-Carvalho, R. R., Gomes-Carneiro, M. R., Coelho, D. R., Lima, S. V. C., Paumgarten, F. J. R. and Aguiar, J. L. A. (2016). Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydrate Polymers*, 137, 556-560.
- Podarala, V., Lakshmi, M. P., Venkata, S. K. R. and Devalam, R. P. (2020). Efficacy of BCG vaccine and Mitomycin C for the treatment of ocular squamous cell carcinoma in bovines. *Research in Veterinary Science*, 133, 48-52.
- Pooja, D., Panyaram, S., Kulhari, H., Rachamalla, S. S. and Sistla, R. (2014). Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, 110, 1-9.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J. and Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592-607.
- Prasanna, P. H. P., Bell, A., Grandison, A. S. and Charalampopoulos, D. (2012). Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 533-540.
- Pristyazhnyuk, I. E. and Menzorov, A. G. (2018). Ring chromosomes: From formation to clinical potential. *Protoplasma*, 255(2), 439-449.
- Priyadarsini, R. V. and Nagini, S. (2012). Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Promises and pitfalls. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1), 125-136.
- Puyo, S., Montaudon, D. and Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 43-61.

- Qureshi, M. A., Bloom, S. E., Hamilton, J. W. and Dietert, R. R. (1989). Toxic effects of methyl methanesulfonate (MMS) on activated macrophages from chickens. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 13(3), 253-262.
- Raftis, E. J., Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G. E. and O'Toole, P. W. (2011). Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 954-965.
- Rajiv, S., Jerobin, J., Saranya, V., Nainawat, M., Sharma, A., Makwana, P., Gayathri, C., Bharath, L., Singh, M., Kumar, M., A Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes *in vitro*. *Human & Experimental Toxicology*, 35(2), 170-183.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Zhang, H., Ashraf, M., Fang, H., Zeng, X., Wu, Y., Khurshid, M., Liqing Zhao, L. and He, Z. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186, 110734.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K. and Yadav, U. C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183-193.
- Rashid, S. (Ed.). (2017). Classification of chemopreventive agents. In *Cancer and Chemoprevention: An Overview*, Springer, pp. 57-63.
- Registre, M. and Proudlock, R. (Eds.). (2016). The *in vitro* chromosome aberration test. In *Genetic Toxicology Testing*, Academic Press, pp. 207-267.
- Rjiba-Touati, K., Ayed-Boussema, I., Guedri, Y., Achour, A., Bacha, H. and Abid-Essefi, S. (2016). Effect of recombinant human erythropoietin on mitomycin C - Induced oxidative stress and genotoxicity in rat kidney and heart tissues. *Human & Experimental Toxicology*, 35(1), 53-62.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Mosqueda-Tapia, G. and Altamirano-Lozano, M. A. (2017). Genotoxicity assessment of human peripheral lymphocytes induced by thallium (I) and thallium (III). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99(5-6), 987-998.
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 332(6032), 974-977.
- Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L. and Levy, E. (2006). Short-chain fatty acids: Ready for prime time. *Nutrition in Clinical Practice*, 21(4), 351-366.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M. and Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3), 679-693.

- Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y. and Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Oolymers*, 217, 79-89.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C. G. and Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440-1453.
- Sanlibaba, P. and Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2, 115.
- Santos, F. L. and Amorim, G. M. (2018). Biotechnological challenges and perspectives of using exopolysaccharides. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(3), 264-266.
- Sanz-Serrano, J., de Cerain, A. L., Garayoa, R., Azqueta, A. and Vettorazzi, A. (2020). Genotoxicity evaluation of fried meat: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 110943.
- Saravanan, C., Rajesh, R., Kaviarasan, T., Muthukumar, K., Kavita, D. and Shetty, P. H. (2017). Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, 15, 33-40.
- Sardar, U. R., Bhargavi, E., Devi, I., Bhunia, B. and Tiwari, O. N. (2018). Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: a critical review. *Carbohydrate Polymers*, 199, 353-364.
- Sassi, A., Boubaker, J., Loussaief, A., Jomaa, K., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2021). Protective Effect of Chrysin, a Dietary Flavone against Genotoxic and Oxidative Damage Induced by Mitomycin C in Balb/C Mice. *Nutrition and cancer*, 73(2), 329-338.
- Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M. and Sofuni, T. (2002). Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: A model for the formation of triradial chromosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 57-65.
- Savage, J. R. (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 13(2), 103-122.
- Schrader, T. J. (2016). Mutagens. In Caballero, B. Finglas, P. M. and Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, pp. 20-28.
- Schwabe, R. F. and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(11), 800-812.
- Schwartz, J. L. (1989). Monofunctional alkylating agent-induced S-phase-dependent DNA damage. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 216(2), 111-118.

- Shaheen, S., Sultana, S., Uddin, M. N. and Mohammad, A. S. (2018). Principles of toxicology: A clinical review. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 145-150.
- Sharma, O. P. and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shih, I. L. (2010). Microbial exopolysaccharides for biomedical applications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(14), 1345-1355.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Ramasamy, K., Sieo, C. C. and Ho, Y. W. (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PloS One*, 12(5), e0175959.
- Shukla, A., Mehta, K., Parmar, J., Pandya, J. and Saraf, M. (2019). Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. *European Polymer Journal*, 119, 298-310.
- Siddique, Y. H., Akhtar, S., Rahul, Ansari, M. S., Shakya, B., Jyoti, S. and Naz, F. (2019). Protective effect of luteolin against methyl methanesulfonate-induced toxicity. *Toxin Reviews*, 40(1), 65-76.
- Singh, N. P. (2016). The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 23-30.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Singh, P. and Saini, P. (2017). Food and health potentials of exopolysaccharides derived from lactobacilli. *Microbiology Research Journal International*, 22(2), 1-14.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękała, E. and Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55(2), 273-285.
- Smerhovsky, Z., Landa, K., Rössner, P., Brabec, M., Zudova, Z., Hola, N., Pokorna, Z., Mareckova, J. and Hurychova, D. (2001). Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 41-45.
- Smithson, J., Kellick, K. A. and Mergenhagen, K. (Eds.). (2017). Nutritional modulators of pain in the aging population. In *Nutritional Modulators of Pain in the Aging Population*, Elsevier, pp. 191-198.
- Speit, G. and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.
- Spicer, E. J. F., Goldenthal, E. I. and Ikeda, T. (1999). A toxicological assessment of curdlan. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4), 455-479.

- Stults, D. M., Killen, M. W., Marco-Casanova, P. and Pierce, A. J. (2020). The Sister Chromatid Exchange (SCE) Assay. In *Molecular Toxicology Protocols*, 1105, 441-457.
- Sun, M. L., Zhao, F., Shi, M., Zhang, X. Y., Zhou, B. C., Zhang, Y. Z. and Chen, X. L. (2015). Characterization and biotechnological potential analysis of a new exopolysaccharide from the Arctic marine bacterium *Polaribacter* sp. SM1127. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12.
- Suspiro, A. and Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: A minireview. *Toxicology Letters*, 207(1), 42-52.
- Suvarna, C., Chaitanya, N. C., Ameer, S., Inamdar, P., Alugubelli, S. and Bhagyanagar, A. (2020). Chemopreventive agents in oral premalignancy: A medical management review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 10(2), 127.
- Swallah, M. S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H. and Yu, H. (2020). Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols) in fruits. *International Journal of Food Science*, 9081686.
- Szende, B., Tyihak, E. and Kiraly-Veghely, Z. (2000). Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Experimental & Molecular Medicine*, 32(2), 88-92.
- Tang, C., Ding, R., Sun, J., Liu, J., Kan, J. and Jin, C. (2019). The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses - A review. *Food & Function*, 10(5), 2290-2312.
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q., Wu, J. and Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydrate Polymers*, 173, 654-664.
- Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J. M., Welling, G. W., Smart, J. and Gopal, P. K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2578-2588.
- Tchah, H., Lee, S. A., Sung, K., Cho, B. J. and Kook, M. S. (2003). Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(5), 1912-1917.
- Thursby, E. and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology*, 2(9), 575-579.
- Tsuda, H., Hara, K. and Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2960-2966.

- Turkez, H., Arslan, M. E. and Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089-1098.
- Turkez, H., Aydin, E. and Aslan, A. (2012). *Xanthoria elegans* (Link)(lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64(6), 679-686.
- Udroiu, I. and Sgura, A. (2017). Cytogenetic tests for animal production: State of the art and perspectives. *Animal Genetics*, 48(5), 505-515.
- Ünal, F., Ataseven, N., Keskin, A. C. and Yuzbasioglu, D. (2016). Answer to letter sent by Dr. MD Rogers (Chairman of the International Glutamate Technical Committee (IGTC), Belgium) related to Ataseven et al. article published in Food and Chemical Toxicology 2016; 91: 8-18. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 94, 262-267.
- Ünal, F., Taner, G., Yuzbasioglu, D. and Yilmaz, S. (2013). Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 65(4), 553-565.
- Vael, C. and Desager, K. (2009). The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current Opinion in Pediatrics*, 21(6), 794-800.
- Vega-Hernández, K., Antuch, M., Cuesta-Rubio, O., Núñez-Figueredo, Y. and Pardo-Andreu, G. L. (2017). Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 134-147.
- Velickova, N. and Kamcev, N. (2014). Genotoxicological effects of heavy metals on humans cells. *American Journal of Environmental Protection*, 2(4), 71-73.
- Velickova, N. and Milev, M. (2020). Genotoxicity test methods - A tool for DNA and chromosome damage biomonitoring. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 148(9-10), 626-630.
- Vlaykova, T., Dimitrova, I., Pavlov, I. and Tacheva, T. (2013). Cancer prevention - Dietary anticarcinogens. *Medicine*, 3(1), 381-392.
- Vlckova, V., Nadova, S., Duhova, V., Závodná, K., Moranova, Z., Rauko, P., Kogan, G. and Miadokova, E. (2006). Natural microbial polysaccharide sulphoethyl glucan as antigenotoxic and cancer preventing agent. *Neoplasma*, 53(6), 524.
- Vodenkova, S., Kroupa, M., Polivkova, Z., Musak, L., Ambrus, M., Schneiderova, M., Kozevnikovova, R., Vodickova, L., Rachakonda, S., Hemminki, K., Rajiv Kumar, P. and Vodicka, P. (2020). Chromosomal damage and telomere length in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Oncology Reports*, 44(5), 2219-2230.
- Wang, G., Zhai, Z., Ren, F., Li, Z., Zhang, B. and Hao, Y. (2020). Combined transcriptomic and proteomic analysis of the response to bile stress in a centenarian-originated probiotic *Lactobacillus salivarius* Ren. *Food Research International*, 137, 109331.

- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q. and Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5692852
- Wang, J., Salem, D. R. and Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*, 205, 8-26.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y. and Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M. and Dong, M. (2014). Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 71-78.
- Wang, X.-H., Andrae, L. and Engeseth, N. J. (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6923-6928.
- Wang, Y., Gray, J. P., Mishin, V., Heck, D. E., Laskin, D. L. and Laskin, J. D. (2010). Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(6), 1852-1863.
- Wattenberg, L. W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, 45(1), 1-8.
- Wojcik, A., Bruckmann, E. and Obe, G. (2004). Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 304-309.
- Wu, H., Zhang, H., Wang, C., Wu, Y., Xie, J., Jin, X., Yang, J. and Ye, J. (2011). Genoprotective effect of hyaluronic acid against benzalkonium chloride-induced DNA damage in human corneal epithelial cells. *Molecular Vision*, 17, 3364.
- Wu, K. G., Li, T. H. and Peng, H. J. (2012). *Lactobacillus salivarius* plus fructo-oligosaccharide is superior to fructo-oligosaccharide alone for treating children with moderate to severe atopic dermatitis: a double-blind, randomized, clinical trial of efficacy and safety. *British Journal of Dermatology*, 166(1), 129-136.
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y. and Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475-499.
- Yadav, V., Prappulla, S. G., Jha, A. and Poonia, A. (2011). A novel exopolysaccharide from probiotic *Lactobacillus fermentum* CFR 2195: Production, purification and characterization. *Biotechnol Bioinf Bioeng*, 1(4), 415-421.
- Yıldız, H. and Karataş, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41-46.

- Yılmaz, S., Ünal, F. and Yüzbaşıoğlu, D. (2009). The *in vitro* genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 60(1-3), 55.
- Yip, M. Y. (2015). Autosomal ring chromosomes in human genetic disorders. *Translational Pediatrics*, 4(2), 164-174.
- You, X., Li, Z., Ma, K., Zhang, C., Chen, X., Wang, G., Yange, L. Donga, M., Ruia, X., Zhanga, Q. and Li, W. (2020). Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5. *Carbohydrate Polymers*, 235, 115977.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2), 53-59.
- Zeweil, H. S., Rizk, R. E., Bekhet, G. M. and Ahmed, M. R. (2015). Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 70, 1-15.
- Zhang, J., Gao, H. and Xue, Q. (2020). Potential applications of microbial enhanced oil recovery to heavy oil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(4), 459-474.
- Zhang, M., Fan, X., Fang, B., Zhu, C., Zhu, J. and Ren, F. (2015). Effects of *Lactobacillus salivarius ren* on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Microbiology*, 53(6), 398-405.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. and Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zhou, Y., Cui, Y. and Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-332.
- Zhu, J., Zhu, C., Ge, S., Zhang, M., Jiang, L., Cui, J. and Ren, F. (2014). *Lactobacillus salivarius ren* prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 208-216.



GAZİ GELECEKTİR..