T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı

KROM PİKOLİNAT'IN OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARI OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan
Meryem (GÜLTEKİN) ŞENTÜRK

Danışmanlar
Prof. Dr. Fatma UYANIK
Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Doktora Tezi

Aralık 2014
KAYSERİ

T.C
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı

KROM PİKOLİNAT'IN OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARI OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Meryem (GÜLTEKİN) ŞENTÜRK

Danışmanlar
Prof. Dr. Fatma UYANIK
Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Doktora Tezi

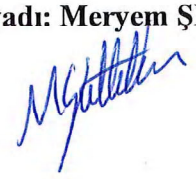
Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSD-10-3326 nolu proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Meryem ŞENTÜRK

İmza: 

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Krom Pikolinat'ın Oksidatif ve Kromozomal DNA Hasarı Oluşumuna Etkisinin Belirlenmesi" adlı **Doktora** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Meryem ŞENTÜRK

Danışman

Prof. Dr. Fatma UYANIK

Biyokimya ABD Başkanı

Prof. Dr. Meryem EREN

Prof. Dr. Fatma UYANIK ve Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında **Meryem ŞENTÜRK** tarafından hazırlanan **"Krom Pikolinat'ın Oksidatif ve Kromozomal DNA Hasarı Oluşumuna Etkisinin Belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı'nda **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

26 /12/2014

JÜRİ: **İmza**

Danışman I : Prof. Dr. Fatma UYANIK
(Emekli Öğretim Üyesi, Biyokimya AD)

Danışman II : Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU
(Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ
(Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları)

Üye : Prof. Dr. Meryem EREN
(Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD)

Üye : Doç. Dr. Savaş SARIÖZKAN
(Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği AD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tezim süresince engin bilgileri ile beni aydınlatan ve yönlendiren, sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Danışmanlarım Prof. Dr. Fatma UYANIK ve Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU'ya, çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Meryem EREN'e, çalışmalarım sırasında manevi desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ'ye, tez çalışmam süresince emeklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kanber KARA'ya, Dr. Ülfet ÇETİNKAYA'ya, Uzman Biyolog Pakize YİĞİT'e, Vet. Hek. Oğuzhan ERÇEL'e ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma, ayrıca her türlü desteğini arkamda hissettiğim bütün sıkıntılarıma katlanan sevgili eşim Özgür ŞENTÜRK'e, kızım Zeynep Cemre ŞENTÜRK'e ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KROM PİKOLİNAT'IN TAVŞANLARDA OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARI OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Meryem ŞENTÜRK

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Aralık 2014

Danışmanlar: Prof. Dr. Fatma UYANIK

Yrd. Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

KISA ÖZET

Bu çalışmada, tavşanlarda $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asidin malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ile genom hasarı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 16 haftalık 40 adet Yeni Zelanda tavşanı, her birinde 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olup, bu hayvanlara distile su; ikinci gruptaki hayvanlara $CrCl_3.6H_2O$ formunda 20 mg Cr; üçüncü gruptakilere 200 µg CrPic; dördüncü gruptaki hayvanlarda 1400 µg pikolinik asit gavaj yöntemiyle 50 gün verildi. Hayvanların haftada bir canlı ağırlıkları ve yem tüketimleri kaydedildi. Denemenin 25. ve 50. günlerinde hayvanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda MDA, plazmalarda 8-OHdG düzeyleri ve tam kanda mikronükleus (MN), nükleoplazmik köprü (NPK) ve nükleer bud (NBUD) miktarları ile apoptotik ve nekrotik hücre sayıları saptandı. Ayrıca, 50. günde elde edilen serumlarda Cr düzeyleri ve karaciğer dokularında MDA düzeyleri belirlendi. Canlı ağırlık artışının yem tüketimindeki artışa paralel olarak CrPic verilen grupta en fazla olduğu saptandı. Çalışmanın 25. gününde kontrole göre CrPic ve pikolinik asit verilen gruplarda serum MDA($P<0,05$) düzeyleri ile tam kan MN, NPK ve NBUD sıklığında ($P<0,05$), $CrCl_3.6H_2O$ ve CrPic verilen gruplarda da plazma 8-OHdG düzeylerinde ($P<0,05$) azalmalar gözlendi. Ancak 50. günde incelenen parametrelerin uygulamalardan etkilenmediği görüldü. Sonuç olarak, çalışmanın 25. gününde CrPic ve pikolinik asit; MDA, 8-OHdG ve genom hasarı göstergelerinde iyileşmeye neden olduğundan tavşanlara kısa süreli CrPic verilmesinin oksidatif ve kromozomal DNA hasarının önlenmesinde etkili olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Krom Pikolinat, Mikronükleus, Oksidatif Stres.

EFFECTS OF CHROMIUM PICOLINATE ON THE FORMATION OF OXIDATIVE AND CHROMOSOMAL DNA DAMAGE

Meryem ŞENTÜRK

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Biochemistry

PhD.Thesis, December 2014

Supervisors: Prof. Dr. Fatma UYANIK

Assist. Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of $CrCl_3.6H_2O$, CrPic and picolinic acid on the levels of malondialdehit (MDA) and 8-hidroksi-2'-deoksiguanosine (8-OHdG) as well as on the genom damage in rabbits. Forty, 16 weeks old, New Zealand rabbits were assigned to four groups consisting of 10 rabbits per group. The rabbits in the first group named as control group, were given distilled water; the rabbits in the second group were given 20 mg in the form of $CrC1_3.6H_20$; the rabbits in the third group were given 200 µg CrPic; and the rabbits in the fourth group were given 1400 µg picolinic acid using the gavaj method for 50 days. Live weight and feed consumption were recorded at weekly intervals. On the $25^{th}$and 50^{th}day of the experiment, the levels of 8-OHdG in plasma, the MDA in sera and the apoptotic and necrotic cells as well as amounts of MN, NPK and NBUD in whole blood were detected. In addition, Cr levels were determined in the sera, the levels of MDA were determined in the liver tissues. In the group receiving CrPic an increase was seen in live weight in paralel with the increased feed consumption. On the 25^{th}day of the experiment, a decrease was detected in the levels of MDA ($P<0,05$) and MN, NPK ve NBUD frequencies ($P<0,05$) in the CrPic and picolinic acid groups as well as in the levels of 8-OHdG ($P<0,05$) in the $CrCl_3.6H_2O$ and CrPic groups. However, no significant effects of the treatments were observed on 50^{th}day of the experiment. In conlusion, CrPic and picolinic acid resulted in improvements in the levels of MDA, 8-OHdG and genom damage indicators thus short term application of CrPic may be effective in reducing oxidative and chromosomal DNA damage in rabbits.

Key Words: Apoptosis, Chromium Picolinate, Micronucleus, Oxidative Stress.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ x
KISALTMALAR xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1.KROM 3
2.1.1. Kromun Kimyasal Özellikleri, Doğada Bulunuşu ve Krom Kaynakları 3
2.1.2. Kromun Metabolizması 4
2.1.3. Krom İhtiyacı ve Kromun Biyolojik Fonksiyonları 6
2.1.4. Krom Yetersizliği ve Toksisitesi 9
2.2. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI 10
2.2.1. Oksidatif Stres 10
2.2.2. DNA Hasarı 13
2.2.3. Oksidatif Stres ile DNA Hasarının İlişkisi 13
2.2.3.1. 8-Hidroksi-2-Deoksiguanosin 13
2.3. MİKRONÜKLEUS (MN) 15
2.3.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları 15
2.3.2. Mikronükleusun Test Olarak Kullanılması 15
2.3.3. Sitokinez-Bloke Mikronükleus Sitom (Cytome) Yöntemi 15
2.4. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI ÜZERİNE KROMUN ETKİSİ 21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. GEREÇ 24
3.1.1. Hayvan Materyali 26
3.1.2. Barınma ve Yetiştirme Koşulları 26

Sayfa No

3.1.3. Deneme Düzeni ve Hayvanların Beslenmesi 26
3.1.4. Örneklerin Toplanması 28
3.2. YÖNTEM 28
3.2.1. Canlı Ağırlık Değişiminin Belirlenmesi 28
3.2.2. Yem Tüketiminin Belirlenmesi 28
3.2.3. Yem Analizleri 29
3.2.3.1. Yemin krom düzeyinin belirlenmesi 29
3.2.4. Kan Analizleri 29
3.2.4.1. Serum ve doku malondialdehit düzeylerinin belirlenmesi.... 29
3.2.4.2. Plazma 8-hidroksi 2'-deoksiguanosin düzeyinin belirlenmesi 31
3.2.4.3. Serum krom analizi 33
3.2.4.4. Sitokinez bloke mikronükleus sitom (cytome) yöntemi 34
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi 39
4. BULGULAR 40
4.1. PERFORMANS 40
4.1.1. Canlı Ağırlık Değişimi 40
4.1.2. Yem Tüketimi 41
4.2. KAN PARAMETRELERİ 42
4.2.1. Oksidatif Stres (Malondialdehit) Sonuçları 42
4.2.1.1. Serum malondialdehit düzeyleri 42
4.2.1.2. Doku malondialdehit düzeyleri 44
4.2.2. Serum Krom Düzeyleri 44
4.2.3. Oksidatif DNA Hasarı (8-OHdG) Sonuçları 44
4.2.4. DNA Hasar Sonuçları (Mikronükleus, Nükleer Plazmik Köprü ve Nükler Bud Sıklığı) 47
4.2.5. Sitotoksite Sonuçları (Apoptotik ve Nekrotik Hücre Sıklığı). 49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 52
6. KAYNAKLAR 57
ÖZGEÇMİŞ

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 3.1. Deneme grupları 27
Tablo 3.2. Tavşan yeminin besin madde miktarları……. 27
Tablo 3.3. Yem ve serumda Cr analizi için ICP/MS'de uygulanan sıcaklık ve basınç değerleri……..... 33
Tablo 4.1. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanların canlı ağırlık (kg) değişimleri……. 41
Tablo 4.2. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanların toplam yem tüketimleri (kg) ……..... 41
Tablo 4.3. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün serum MDA düzeyleri……..... 42
Tablo 4.4. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda doku MDA düzeyleri……. 44
Tablo 4.5. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 50. gün serum Cr düzeyleri……..... 44
Tablo 4.6. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün 8-OHdG düzeyleri…… 45
Tablo 4.7. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit gruplarının kültüre edilmiş periferal lenfositlerinde 25. gün ve 50. gün DNA hasar oranlarının (MN, NPK, NBUD sıklığının) karşılaştırılması…. 47
Tablo 4.8. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit gruplarının 25. ve 50. günde alınan kan örneklerinin kültüre edilmiş periferal lenfositlerindeki hücre ölüm oranlarının karşılaştırılması… 50

Şekil 2.1. Krom pikolinatın kimyasal yapısı…… 4
Şekil 2.2. İnsülin reseptörünün kinaz aktivitesinin insüline cevap olarak kromodulin tarafından uyarılmasını gösteren bir mekanizma…..... 6
Şekil 2.3. Oksidatif DNA hasarı (Serbest radikal aracılı) ……..... 11
Şekil 2.4. Malondialdehitin kimyasal yapısı……..... 12
Şekil 2.5. 8-OHdG'nin moleküler yapısı……..... 14
Şekil 2.6. Binükleer hücreler…… 16

Şekil 2.7. Binükleer hücrelerde a) Mikronükleus (MN), b) Nükleoplazmik köprü (NPB), c) Nükleer bud (NBUD)..…… 17
Şekil 2.8. a) Mononükleer hücre, b) Multinükleer hücre…… 18
Şekil 2.9. a) Apoptotik hücre, b) Nekrotik hücre…… 18
Şekil 2.10. Çeşitli sitotoksik ve genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra, kültüre edilmiş sitokinez-bloke hücrelerin olası kaderi (MN: mikronükleus; NPB: nükleoplazmik köprü, NBUD: nükleer bud) 19
Şekil 3.1. Malondialdehit'in Standart Kalibrasyon Eğrisi..... 31
Şekil 3.2. 8-Hidroksi 2'-Deoksiguanosin'in Standart Kalibrasyon Eğrisi 32
Şekil 3.3. a. Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'lü BN hücre; g. NBUD'lu BN hücre; h; Apoptotik hücre; i; Nekrotik Hücre. 39
Şekil 4.1. Krom klorür, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün serum MDA düzeyleri..... 43
Şekil 4.2. Krom klorür, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün 8-OHdG düzeyleri 46
Şekil 4.3. 25. günde alınan kan örneklerindeki MN, NPK, NBUD, apoptotik, nekrotik hücre frekansları (%)..... 48
Şekil 4.4. 50. günde alınan kan örneklerindeki MN, NPK, NBUD, apoptotik, nekrotik hücre frekansları (%)..... 48
Şekil 4.5. 25. ve 50. gün alınan kan örneklerindeki apoptotik ve nekrotik hücre frekansları (%). 51

KISALTMALAR

Cr	: Krom
Cr^{+2}	: İki değerlikli (indirgen krom)
Cr^{+3}	: Üç değerlikli krom
Cr^{+6}	: Altı değerlikli krom
$CrCl_3$	: Krom klorür
CrPic	: Krom pikolinat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
$C_6H_5NO_2$	: Pikolinik asit
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
MDA	: Malondialdehit
GTF	: Glikoz Tolerans Faktör
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
TC	: Total kolesterol
Ca^{+2}	: Kalsiyum
Mn	: Mangan
Fe	: Demir
Zn^{+2}	: Çinko
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Derneği
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
$O_2^{-\cdot}$	: Süperoksit radikali
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$HO^{\cdot}$	: Hidroksil radikali
HOCl	: Hipokloröz asit
$O_2^{\uparrow\downarrow}$	: Singlet oksijen
$LOO^{\cdot}$	: Lipid peroksil radikali

LOOH	:	Lipid peroksit
Be	:	Berilyum
Sc	:	Skandiyum
Ra	:	Radyum
Bi	:	Bizmut
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
MN	:	Mikronükleus
CBMN	:	Sitokinez-blok
NPB	:	Nükleoplazmik köprü
NBUD	:	Nükleer bud
NDI	:	Nükleer bölünme indeksi
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör
IL-	:	İnterlökin
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
$R^{\cdot}$	:	Alkil radikali
$RCOO^{\cdot}$	:	Organik peroksit radikali
$RO^{\cdot}$	:	Alkoksil radikali
$ROO^{\cdot}$	:	Peroksil radikali
TBA	:	Thiobarbütirikasit
KH_2PO_4	:	Monopotasyum fosfat
Na_2HPO_4	:	Sodyum bifosfat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üç değerlikli krom (Cr^{+3}); karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit metabolizmalarının düzenlenmesi için gerekli olan esansiyel bir iz elementtir (1-3). Krom yetersizliğinin tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve glikoz intoleransına benzer semptomlara yol açabileceği; büyüme geriliği, glikoz ve lipid homeostazisi bozukluklarının krom yetersizliğiyle ilişkili olduğu (1, 4); bu semptomların krom ilavesi ile düzeltilebildiği çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür (4-6).

Krom bileşikleri hem organik hem de inorganik halde bulunurlar (7). Organik Cr bileşiklerinin inorganik Cr bileşiklerine göre daha kolay emildiği saptanmıştır (8, 9). Kromun emilimini artırmak için pikolinik asit, nikotinik asit, propiyonik asit ve metiyonin gibi organik maddelerle bileşikler oluşturulmuştur (10, 11). Pek çok çalışma ile çeşitli krom bileşiklerinin insanlar (12, 13) ve hayvanlar (14-19) için yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Krom pikolinat, özellikle insanlarda, yaygın olarak kullanılan bir besin takviyesidir. Krom pikolinatın vücut kitlesi ve kompozisyonu üzerine olumlu etkilerinin olduğunu bildiren çeşitli çalışmaların (20, 21) aksine, bu organik krom bileşiğinin vücut kompozisyonu üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar (22-24) da bulunmaktadır.

Özellikle CrPic'ın insanlar üzerindeki etkilerini detaylı şekilde inceleyen çalışmalar, bu organik krom bileşiğinin insanlar üzerinde yararlı etkisinin olmadığını gösterdiği gibi (23, 24), CrPic'ın zararlı etkilerinin de olabileceği (25-31) yönündedir. Bu nedenle son zamanlarda CrPic'ın güvenilirliği sorgulanmaktadır. Diğer taraftan, CrPic'ın sitotoksik ve genotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar arasında da çelişkiler bulunmaktadır (26, 29, 31-36). Krom pikolinatın, pikolinat içermesi nedeniyle kromozom hasarına neden olduğu (25); fizyolojik koşullarda CrPic'ın askorbik asit ve thiol gibi biyolojik redüktanlarla Cr^{+2} bileşiklerine indirgendiği, havayla oksidasyona duyarlı oldukları için bu bileşiklerin de deoksiribonükleik asit (DNA) harabiyetine yol açan hidroksil radikallerini oluşturduğu ileri sürülmektedir (37-39). Krom pikolinatın sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğunu ileri süren çalışmalar genellikle *in vitro* koşullarda yürütülmüştür (38, 40, 41). *İn vivo* koşullarda ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (27, 31, 42).

İnorganik bir krom bileşiği olan krom klorür ($CrCl_3$)'ün ve organik bir krom bileşiği olan CrPic'ın *in vivo* olarak hücresel ve genetik yönden olumsuz etkilerinin olup olmadığının belirlenmesinin yanı sıra, bu bileşiklerin olumsuz etkileri saptandığı takdirde, bu etkilerin özellikle CrPic verilen çalışmalarda ileri sürüldüğü gibi pikolinik asitten kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi insan ve hayvan sağlığı yönünden önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Cr^{+3}'un $CrCl_3$ formu ile birlikte klastojenik etki gösterdiği bildirilen ve yaygın olarak kullanılan CrPic formunun ve pikolinik asidin ($C_6H_5NO_2$) tavşanlarda, oksidatif stresin göstergesi olarak bilinen malondialdehidin (MDA) serum ve karaciğer düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi ve oksidatif DNA hasarı göstergesi olarak bilinen 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyi ve genom hasarı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KROM

2.1.1.Kromun Kimyasal Özellikleri, Doğada Bulunuşu ve Krom Kaynakları

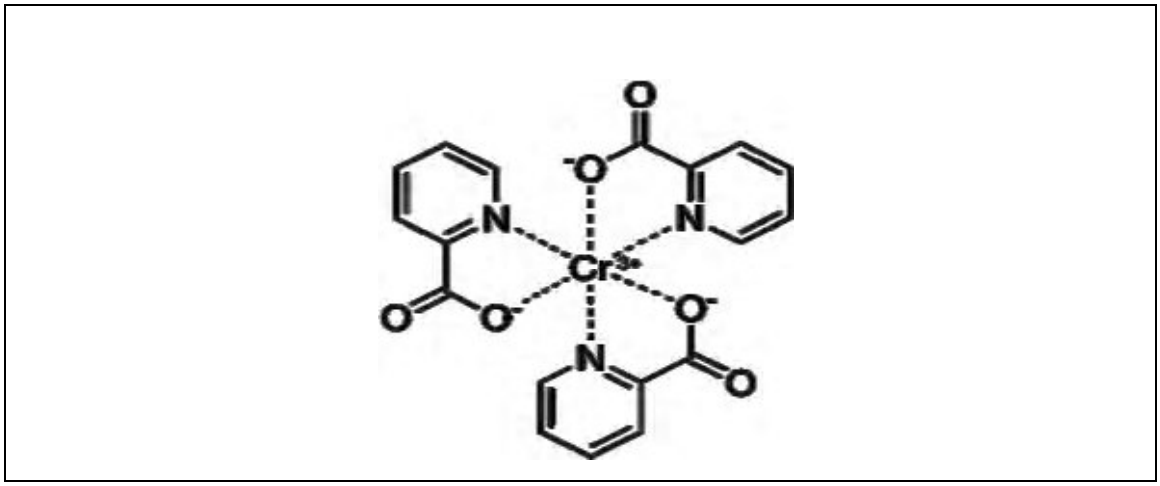
Metalik bir element olan krom, geçiş elementlerinin ilk serisinde VI B grubunda yer alır. Atom numarası 24, kütle numarası 52,01 olan krom, yaygın olarak 0, +2, +3 ve +6 oksidasyon durumlarında bulunmasına (1, 2, 43) rağmen sadece üç değerlikli krom (Cr^{+3}) bileşiklerinin biyolojik sistemlerde fonksiyonu bulunmaktadır. Ayrıca, üç değerlikli krom (Cr^{+3}) ve altı değerlikli krom (Cr^{+6}) bileşikleri endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Topraktaki miktarı ortalama 37-40 ppm; içme sularında 0,4-8,0 µg/L arasında olan krom, yer kabuğunda en fazla bulunan elementler arasında yer alır (1, 43, 44).

Bitkilerdeki krom miktarının bitkinin türüne, toprağın yapısına ve bitkinin hasat dönemine bağlı olarak değiştiği; rafine işlemlerinin de Cr miktarını azalttığı belirtilmiştir (1, 45, 46). Kromun et, süt, sebze ve meyvaların çoğunda düşük miktarda olduğu, öğütülmemiş tahıl ürünleri, baklagiller ve baharatlarda ise daha yüksek miktarda olduğu bildirilmiştir (2, 44).

2.1.2. Kromun Metabolizması

İnce bağırsakların üst bölümünden basit difüzyon dışında bir mekanizmayla emildiği bildirilen (1, 45, 47) kromun duedonuma ulaştığında, buradaki alkali ortamın etkisiyle, ortamda bulunan ligantlarla şelatlar oluşturarak emiliminin kısmen kolaylaştığı belirtilmiştir (1, 48). Vücuda alınan Cr^{+3}'un %0.04-%2 gibi çok az bir kısmının emilebildiği ve bu emilimin besinlerde bulunan okzalat, demir ve karbonhidratlar tarafından etkilendiği açıklanmıştır (45, 48).

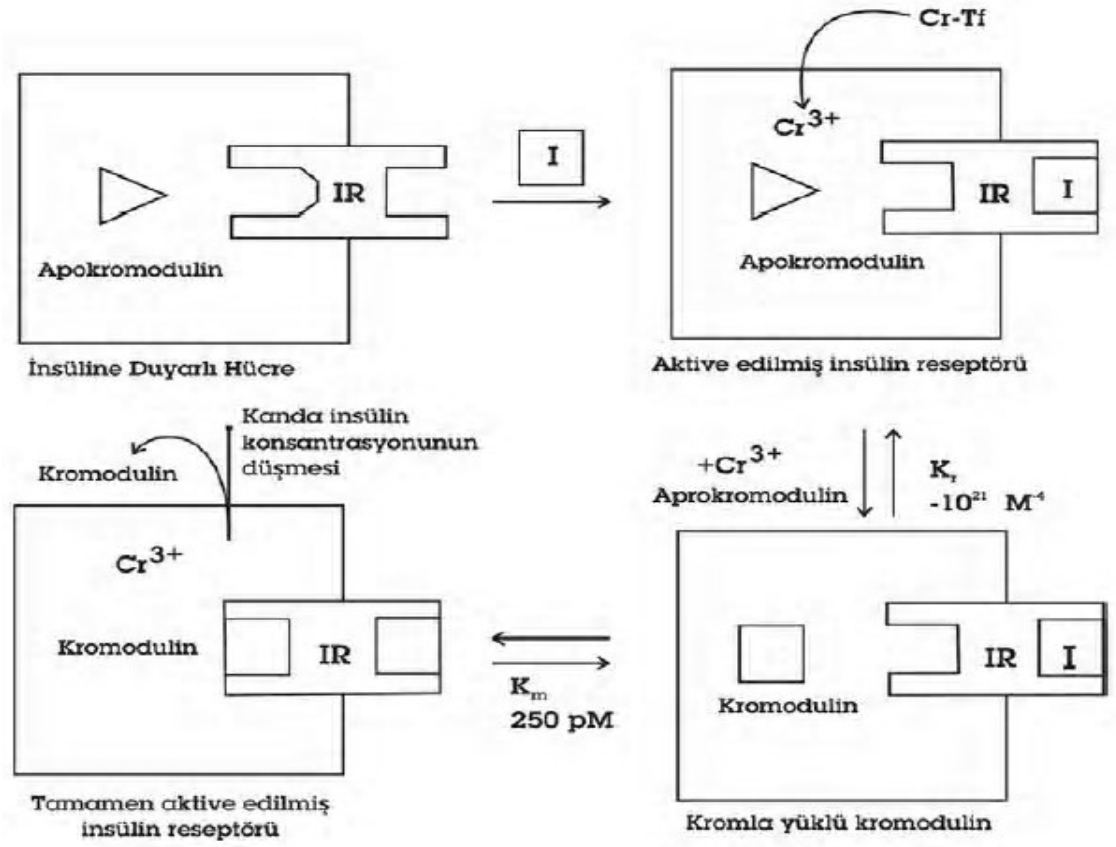
Krom besinlerde hem organik hem de inorganik bileşikler halinde bulunmaktadır (7). Organik Cr bileşiklerinin inorganik Cr bileşiklerine göre daha kolay emildiği bildirilmektedir (48, 49). Krom'un membranlardan geçişinin güç olması nedeniyle emiliminin zayıf olduğu açıklanmıştır (50). Bu nedenle Cr'un, emilimini artırmak için, pikolinik asit, nikotinik asit, propiyonik asit, metiyonin gibi organik maddelerle stabil bileşikleri (10, 49, 51) oluşturulduğu gibi son zamanlarda CrPic'ın nanopartikülleri de oluşturulmuştur (50). Bir triptofan metaboliti olan pikolinik asidin, krom ile birleşerek stabil bir yapıya sahip olan krom pikolinatı (CrPic) oluşturduğu bildirilmiştir (52, 53). Krom pikolinat 1:3 oranında Cr (III) ve pikolinik asitten oluşur. Krom pikolinatta bulunan pikolinik asit 2-pikolinattır. Bir gram krom pikolinat 0,12 g Cr ve 0.88 g pikolinik asit sağlar. Krom pikolinatın kimyasal adı tris (2-piridinkarboksilat-*N,O)* krom (III) ya da 2-piridinkarboksilik asit krom (III) tuzu'dur. Moleküler formülü $C_{18}H_{12}N_3O_6Cr$ ve molekül ağırlığı 418,31 olan CrPic'ın CAS numarası 14639-25-9'dur (53) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Krom pikolinatın kimyasal yapısı (40).

Krom pikolinatın mide sıvısında bozulmadan kaldığı ve doğruca jejunuma geçerek orijinal formunda hücreye girdiği (42, 52, 54); ancak, hücre içinde kalma süresinin kısa olduğu belirtilmiştir. Krom pikolinatın, hepatositlerde ilk önce nükleus ve mitokondride, daha sonra sitozolde son olarak da lizozom ve mikrozomlarda görüldüğü, DNA'ya bağlanma eğilimi göstermediği açıklanmıştır. Hepatosit mikrozomlarında pikolinatın modifiye edilerek kromun açığa çıkmasının sağlandığı; karaciğer ve böbreklerde Cr'un birikim yaptığı, ancak bu birikimin CrPic şeklinde olmadığı bildirilmiştir (54).

Kan dolaşımındaki üç değerlikli Cr'un, transferrin veya diğer plazma proteinlerine bağlı şekilde ya da glikoz tolerans faktörü gibi kompleksler şeklinde sirküle olduğu belirtilmiştir (7). En fazla kromodulin'e ardından transferrin ve albümine affinite gösterdiği bilinen serbest üç değerlikli Cr'un (55) kromodulin'den transferrine veya transferrinden kromodulin'e nakledilebildiği açıklanmıştır (41, 55, 56). Hücrede inaktif durumda olan insüline duyarlı transferrin reseptörleri kan glikoz düzeyinin artışı ile veziküllerden çıkıp hücre membranına göçünü uyarmakta, hücre yüzeyine geçen bu reseptörler Cr ile yüklü transferrini bağlamaktadır. İki metal iyonu bağlamış olan bu transferrin reseptörü endositozisle hücreye girerek, oluşan yeni vezikül içindeki asidik pH'nın etkisiyle metalden ayrılmakta ve serbestleşen Cr apokromodulin'e bağlanmaktadır (52, 57) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İnsülin reseptörünün kinaz aktivitesinin insüline cevap olarak kromodulin tarafından uyarılmasını gösteren bir mekanizma (52).

Kromatlar hariç, kromun tüm kimyasal formları kandan hızla uzaklaştırılabilir. Plazma Cr düzeyi, dokulardaki Cr düzeyi için iyi bir gösterge olmamaktadır. Bu durum, dokulardaki Cr düzeyi ile dolaşımdaki Cr düzeyi arasında bir dengenin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (1). Kroma en büyük affinite retiküloendotelyal sistem tarafından gösterilmektedir (1). Organizmadan atılımı, alınma yoluna bağlı olan Cr, en fazla idrar ve dışkı ile (1) daha az olarak da saç, safra ve ter ile atılmaktadır. Stres, enfeksiyon, yorucu egzersizler, aşırı karbonhidratlı beslenme ve travmaların da vücuttaki Cr atılımını artırdığı bildirilmiştir (58, 59).

2.1.3. Krom İhtiyacı ve Kromun Biyolojik Fonksiyonları

Günlük alınması gereken Cr miktarının kadınlar için 25 µg/gün, erkekler için 35 µg/gün olduğu bildirilmiştir (60). Krom konsantrasyonunun çeşitli vücut sıvı ve dokularında değişkenlik gösterdiği; kromun en fazla böbrekte biriktiği (61, 62), daha az olarak karaciğer, pankreas ve dalakta bulunduğu ve kan, kas, kalp, akciğer ve beyinde ise en az düzeyde olduğu bildirilmiştir (61). Kromun serumdaki düzeyinin 0,066-0,84 µg/L gibi

düşük değerlerde olduğu, ciğerlerde ve diğer dokularda 0,07-1,0 µg/g arasında değiştiği, idrarda ise 7,80-9,68 µg/L gibi yüksek düzeylere ulaştığı (63) bildirilmiştir. Çeşitli hayvan türleri üzerinde Cr ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına karşın hayvanların günlük krom ihtiyacı konusunda kesin bildirimler bulunmamaktadır.

İlk kez ratlarda yapılan çalışmalarla, üç değerlikli Cr'un memeliler için esansiyel olduğu belirlenmiştir (1). Glikoz tolerans faktör (GTF)'ün yapısına katılan (1, 45, 48) Cr'un insülinle etkileşerek sindirime uğrayan karbonhidratların organizmada dağıtılmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (1, 10). Glikoz tolerans faktörün sadece insülin varlığında aktivite gösterebildiği düşünüldüğünden (1, 10) sonraki yıllarda, glikoz tolerans faktör yerine "biyolojik aktif krom" terimi kullanılması önerilmiştir (46).
Krom ile insülin arasındaki ilişki incelendiğinde; Cr'un, insülinin aktivitesini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır (32, 46). Kromun insülin üzerinde yapmış olduğu bu değişimden dolayı karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının da etkilendiği bildirilmektedir (1, 2, 12, 64). Büyükleblebici ve Karagül (56) tarafından ratlarda yapılan çalışmada Cr'un açlık kan glikoz düzeyini etkilemediği ancak insülin düzeyini önemli oranda düşürdüğü bildirilmiştir. Kromun farklı bileşikleri ile yapılan çalışmalarda Cr'un açlık glikoz düzeyi, glikoz toleransı ve insülin duyarlılığını olumlu etkilediği belirlenmiştir (65-67). Krom ilavesi sonucu kan glikoz düzeyinde meydana gelen azalmanın insüline duyarlı dokular tarafından glikozun alınması ve glikojen sentetaz aktivitesindeki artış sonucu glikojen sentezin artmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (46, 68).

Dokulardaki yağ oranının ve kan lipid düzeyinin regülasyonunu sağlayan Cr'un normal lipid metabolizmasının sürdürülebilmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (1, 46). Kromun, yağ dokuda sentezlenen ve salınan, bir obez (ob) gen ürünü olan leptinin (69) serumdaki düzeyini düşürdüğü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (13, 70, 71). Plazma membranındaki kolesterol düzeyini azaltan $CrCl_3$ ve CrPic'ın, membran akışkanlığını artırdığı açıklanmıştır (68, 72). Diyete Cr ilavesinin insanlarda serum trigliserit, total kolesterol, LDL, VLDL, serbest yağ asidi ve fosfolipid düzeylerini düşürdüğü, serum HDL konsantrasyonunu ise yükselttiğini bildiren çalışmaların (64, 72) yanı sıra bu parametrelerin bir kısmının etkilendiğini, bir kısmının ise etkilenmediğini bildiren araştırıcılar da bulunmaktadır (74-78).

Çeşitli hayvan türlerinde Cr'un değişik formları ile yapılan çalışmaların sonuçları arasında uyumsuzluk olduğu belirlenmiştir. Rasyonlarına Cr ilave edilen hayvanlarda Cr'un serum kolesterol, HDL, LDL, serum trigliserit ile glikoz ve HDL/TC oranını etkilemediği (16, 17, 57, 79-83); öte yandan yapılan farklı çalışmalarda serum kolesterol, serum trigliserit, LDL düzeyini düşürdüğü, HDL kolesterol düzeyini ise yükselttiği (17, 57, 81, 83-85) saptanmıştır.

Glikozun kullanımını artırarak nükleer protein ve RNA sentezini artırdığı bildirilen kromun, DNA bütünlüğünün korunmasında da rol oynadığı belirtilmiştir (48, 79). Organik ve inorganik Cr bileşikleri ile çeşitli hayvan türlerinde yürütülen çalışmalarda, Cr'un serum protein düzeylerine etkileri ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Serum albümin düzeyinin Cr ilavesinden etkilenmediğini bildiren (17, 86-88) araştırıcıların aksine domuzlarda yapılan çalışmada serum albümin konsantrasyonunun yükseldiği ve albümindeki artışın insülin aracılığı ile amino asit sentezinin uyarılmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (14).

Kromun mineral metabolizması üzerine etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalarda uyumsuz sonuçlar bildirilmiştir (14, 79, 89). Strese bağlı olarak şekillenen mangan (Mn) ve kalsiyum (Ca)'un üriner kayıplarının Cr ilavesiyle önlenebileceği açıklanmıştır (14). Stres altındaki ruminantların yemine Cr ilavesi strese bağlı olarak atılımı artan Cu, Zn, Mn ve Fe'in atılımını azalttığından bu elementlerin rasyona yeniden ilave edilmelerinin de gerekmeyeceği ileri sürülmüştür (90). Krom ve Fe, transferrine bağlanmak için yarıştıklarından (91), Cr ilavesinin transferrinin saturasyonunda azalmaya yol açtığı ve organizmanın Fe durumunu olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Anderson et al. (92), yeme CrPic formunda ilave edilen Cr'un domuzlarda Cu, Fe ve Zn'nun karaciğer düzeylerini etkilemediğini, ancak böbreklerde Cu düzeyine etki etmezken Fe düzeyinde artışa, Zn düzeyinde ise düşüşe neden olduğunu belirlemişlerdir. Öte yandan, bir diğer çalışmada ise Cr ve Zn absorbsiyonu arasında bir etkileşim olmadığı saptanmıştır (78).

Kromun karbonhidrat, lipid ve protein, metabolizmalarını etkilediği (48) ve insanlarda vücut gelişimi (21), çeşitli hayvan türlerinde performans (18, 68, 81, 93, 94) ve karkas özellikleri (17, 62, 95) ile immüniteyi (14, 18, 19) olumlu etkilediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Çeşitli kaynaklardan sağlanan kromun canlı ağırlık üzerine etkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. Broylerlerde yeme CrPic (96) ve $CrCl_3$ (88)

formlarında ilave edilen Cr'un; hindi palazlarında nikotinik asit formunda ilave edilen Cr'un (87) canlı ağırlığı artırdığı belirtilmesine karşın broylerlerde (80) ve bıldırcınlarda (93, 97) $CrCl_3$ den sağlanan 20 mg/kg Cr ve 20, 40, 80 ve 100 mg Cr ile yapılan (62) çalışmalarda canlı ağırlığın etkilenmediği bildirilmiştir.

2.1.4. Krom Yetersizliği ve Toksisitesi

Besin maddelerinin Cr içeriğinin düşük olmasının yanısıra öğütme ve rafine işlemlerine bağlı olarak da Cr kayıpları şekillendiğinden besinlerle yeterli düzeyde alınmadığı saptanmıştır (98). Ayrıca, Cr'un biyoyararlılığının düşük olmasının (45, 53) insan ve hayvanlarda Cr yetersizliğine yol açabildiği belirtilmektedir (45). Yaşlılar, protein-enerji malnutrisyonu olan yeni doğanlar ve çocuklar Cr yetersizliğine duyarlıdır (46, 48). Fazla karbonhidrat tüketiminin veya yorucu egzersizlerin oluşturacağı stres faktörleri, Cr'un üriner kaybını artırarak Cr yetersizliğine predispozisyon oluşturur (12, 58). Gebelerde, fetus maternal Cr'u kullandığından Cr yetersizliği şekillenebilir (1, 45, 98).

İnsanlarda krom yetersizliği sonucu diyabet ve kardiyovasküler hastalıklara benzer semptomlar şekillendiği bildirilmiştir (1, 43). Krom yetersizliğinde, beta hücrelerinden insülin salınımının ve dokuların insüline direncinin arttığı ve bu durumun siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı fosfodiesteraz enziminin aktivitesindeki azalmadan ileri geldiği bildirilmektedir (99). Deney hayvanlarında; krom yetersizliğinde büyüme geriliği, serum kolesterol ve trigliserit düzeyinde yükselme, aortik plak oluşum sıklığında artış, korneal lezyonların yanı sıra fertilitede ve sperm sayısında azalma olduğu ileri sürülmüştür (45, 48). Frank et al. (100), Cr yetersizliğinin serum glikoz, laktat ve trigliserit düzeylerini yükselttiğini belirlemişlerdir.

Krom toksisitesinde, Cr'un oksidasyon durumu ve çözünürlüğü rol oynamaktadır. Kromat iyonları (Cr^{+6}) hücre membranından çok hızlı geçebilirler. Ayrıca kromatların çok güçlü oksidan ve irritan olmaları, Cr^{+3}'a göre daha toksik olmalarına neden olmaktadır. Kromat iyonlarının karsinojenik etkisinin DNA lezyonları ve mutasyona neden olduğu bildirilmektedir (1, 48). Altı değerlikli krom bileşikleri Uluslararası Kanser Araştırma Derneği (IARC) tarafından birinci sınıf kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır (101, 102).

Kromun saf metal halinin toksik özelliğinin olmadığı, Cr^{+3}'un yüksek düzeylerinin toksik olabileceği bildirilmiştir. Oral yolla alınan Cr^{+3} miktarıyla toksik etki yapan miktar arasında geniş bir güvenlik sınırı olduğu ve Cr zehirlenmesinin kolay şekillenmediği (1, 48); günde 1 mg'a kadar Cr alımının toksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir (92).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin Gıdalara Katılan Gıda Kaynakları ve Gıda Katkıları Paneli'nin 2010 yılı raporunda; CrPic ile yapılan çalışmalarda 200-600 µg/gün düzeyinde CrPic'ın organizma üzerine olumsuz etkileri olmadığını saptayan çalışmalar bildirilmekle birlikte; kromun Tolere Edilebilir Üst Limiti ile ilgili veri bulunmadığından krom tüketiminde Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilmiş olan günlük 250 µg (48)'ın üzerine çıkılmaması gerektiği de vurgulanmaktadır (53).

2.2. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI

2.2.1. Oksidatif Stres

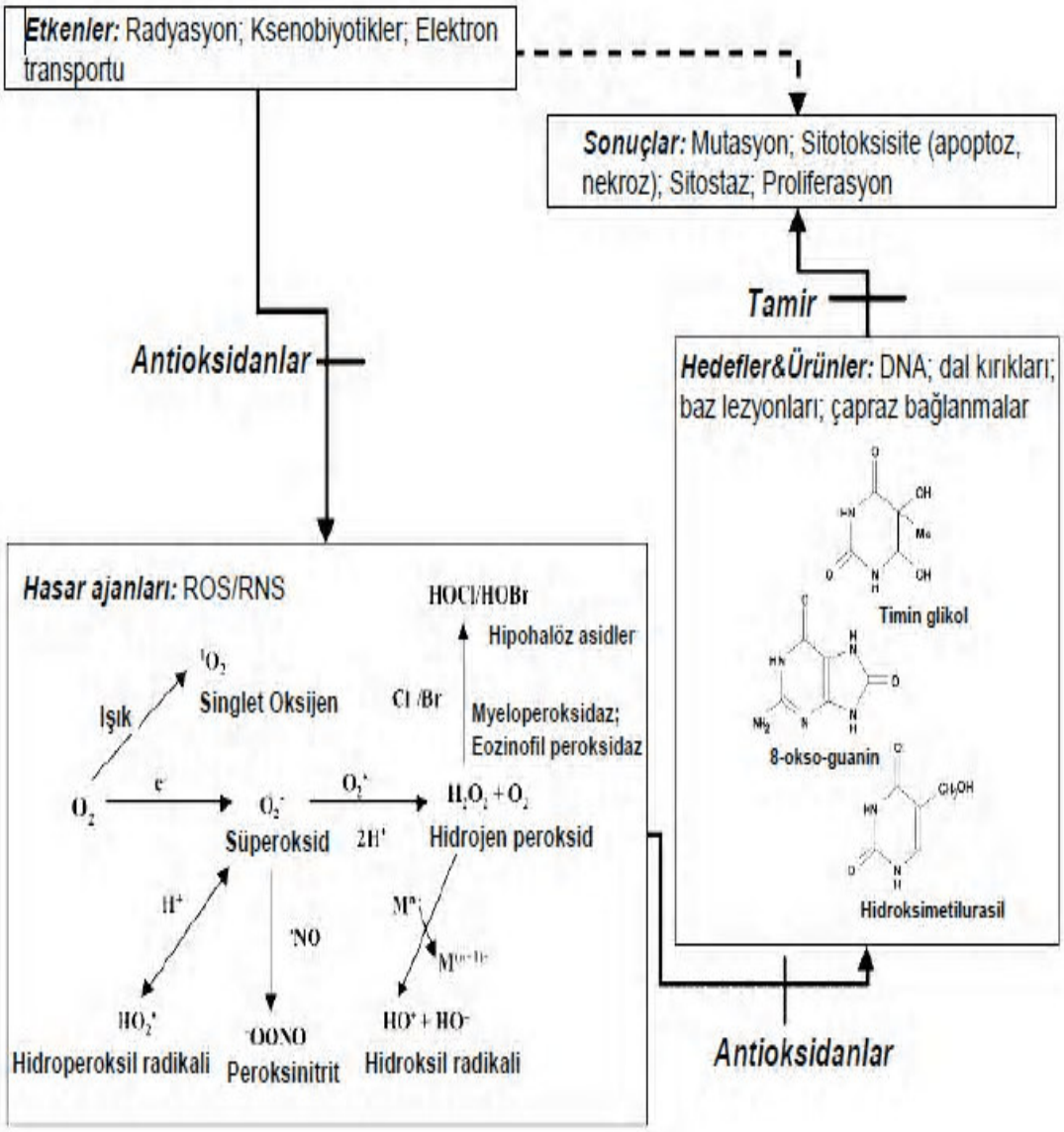
Dış orbitallerinde çiftlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllere radikaller (oksidanlar veya reaktif oksijen türevleri, ROT) denir. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Kararsız bir yapı gösteren ve hemen kararlı yapıya ulaşmak isteyen bu tanecikler çok kısa ömürlüdür. Ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif olup tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilmektedirler (103, 104).

Serbest radikaller, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Mitokondriyal elektron transport zinciri, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması, fagositik hücreler (monosit ve makrofaj, nötrofil, eozinofil) ve endotel hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantofil oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzim sistemleri ve otooksidasyon reaksiyonları, organizmanın normal metabolik faaliyetleri sırasında oluşabilirler. Bu nedenle endojen kaynaklı olabildikleri gibi beslenme, çeşitli olumsuz çevresel faktörler ve ilaç uygulamaları gibi faktörlere bağlı olarak ekzojen kaynaklı da olabilirler (104-106).

Biyolojik sistemlerde oksijenin metabolizması sonucu oluşan başlıca ROT; süperoksit ($O_2^{-\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$), hipokloröz asit (HOCl),

singlet O_2 ($O_2^{\uparrow\downarrow}$), alkil radikali ($R^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$), organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$), perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$) ve alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikalidir (103) (Şekil 2.3).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmez. Serbest radikallerin oluşum hızındaki artma ya da ortadan kaldırılma hızındaki azalma bu dengenin bozulmasına neden olur. Bu durum "oksidatif stres" olarak adlandırılır (107).

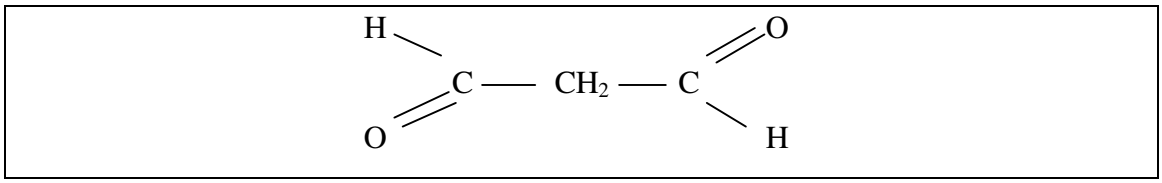


Şekil 2.3. Oksidatif DNA hasarı (Serbest radikal aracılı) (108).

Stres, serbest radikal ve peroksidasyon ara ürünlerinin oluşmasına, dolayısıyla biyolojik membranların bütünlüğünün ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak pek çok patolojik olayın şekillenmesine neden olur (109). Serbest radikallerin bir çok yolla metabolik bozukluklar ve hücre harabiyetine neden olduğu (110) dolayısıyla çeşitli hastalıkların ve yaşlanma sürecinin gelişiminde önemli rol oynadığı belirtilmektedir (111) .

Oksidatif stresin organizmada lipid, protein ve DNA gibi makro moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açtığı bildirilmektedir (112).

Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve $HO^{\cdot}$'nin, bir yağ asitinin metilen kısmından bir hidrojen atomu (H^{+}) koparak bir lipid radikali oluşturduğu başlatma aşaması; oluşan lipid radikaline O_2 ilavesiyle gerçekleşen zincirleme reaksiyon ile lipid peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) ve lipid peroksit (LOOH)'in oluşturduğu ilerleme aşaması; tek elektron üzerinden yeniden yapılanmaya bağlı olarak lipidin yıkımı sonucu MDA, 4-hidroksinonenal, 4-hidroksi-2,3-transnonenal gibi ürünlerin oluştuğu yıkım aşaması ve zincir reaksiyonunun antioksidanlar tarafından gerçekleştirilen sonlandırılma aşaması olmak üzere dört aşamada gelişir. Lipid peroksidasyon ve prostoglandin biyosentezinde doğal olarak meydana gelen mutajenik ve karsinojenik özellikli bir maddedir (113). Hücredeki lipid peroksidasyon ürünleri içinde en çok sentezlenen ve perokside olmuş lipidlerde oluşan en önemli aldehit bileşiklerinden biri olan MDA, trombositlerde araşidonik asit katabolizması esnasında büyük ölçüde reaktif olarak oluşan kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehittir (114) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Malondialdehitin kimyasal yapısı (115).

Doymamış yağ asitlerinin non-enzimatik lipid peroksidasyonu sırasında da üretilen MDA, proteinlerin serbest amino grupları ile fosfolipidlerle ve nükleik asitlerle hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda tepkimeye girebilir (116).

İnsan ve memeli hücrelerinde mutajenik, fare ve sıçanlarda ise karsinojenik etki gösteren (114) MDA, çözünebilir özellikte olup lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan parametrelerden biridir ve oksidatif stres şartlarında kan ve idrarda saptanabilir düzeye ulaşır (97, 104, 117-120). Lipid peroksidasyon düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılan MDA miktar tayini tiyobarbütirik asit testiyle ölçülmektedir (121).

2.2.2. DNA Hasarı

Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, genetik materyalin moleküler yapısında ekzojen ve endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen değişikliklerdir (122, 123). DNA'nın fonksiyonu yapısındaki bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. DNA bazlarının polar gruplarında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye neden olarak mutasyona yol açar (104-106, 124-128). DNA üzerinde oluşan hasarları onaran spesifik onarım sistemleri vardır. DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanırlar. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne neden olur (44, 106).

2.2.3. Oksidatif Stres ile DNA Hasarının İlişkisi

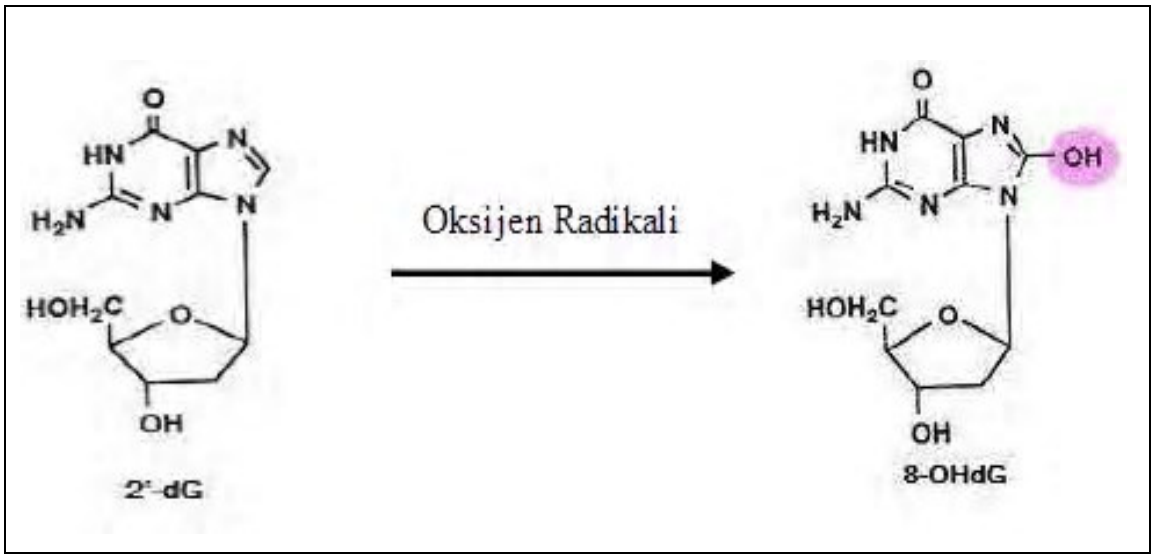
Lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik makromoleküller üzerinde etkili olan oksidatif stresin (reaktif oksijen türevleri) DNA hasarına da neden olduğu bilinmektedir (126, 129-131). Farklı mekanizmalar ile DNA hasarına yol açan oksidatif stres, DNA'nın kararlı yapısını etkilemektedir (132, 133). Reaktif oksijen türevleri, DNA'da bazların yapısında değişikliğe yol açarak yanlış baz eşleşmelerine ve dolayısıyla mutasyonlara yol açabilir (104, 105, 124-128, 133).

2.2.3.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

Reaktif oksijen türevlerinden kaynaklanan çok sayıda DNA hasarı tanımlanmış olup, 8-OHdG'in de bu hasarlardan birisi olduğu kabul edilmektedir (133-136). Deoksiribonükleik asit bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan guanininin ROT'nin esas hedef noktası olduğu (123, 135, 136) ve C8-hidroksiguanin (8-OHGua) ya da guanin'in nükleozid formu olan deoksiguanozin (8-

hidroksi-2'-deoksiguanozin) (8-OHdG) oluştuğu (123) bildirilmiştir. Bu olayda önce HO radikali ve DNA bazları birleşir sonra bir elektron kaybedilerek 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşur (Şekil 2.5). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin keto-enol tautomerizmine uğrayarak bir oksidasyon ürünü olan 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG) oluşur (123).

Guaninde meydana gelen bu modifikasyonun, DNA replikasyonu esnasında GC →TA nokta mutasyonlarına yol açarak yanlış baz eşleşmelerine neden olduğu bildirilmiştir (123, 131, 133, 135-137). Oluşan bu hasarlı bazın DNA tamir mekanizması ile onarılması sırasında oluşabilecek hatalarında yeni hasarların ortaya çıkmasına sebep olduğu açıklanmıştır (138). Bu nedenle oksidatif DNA hasarını belirlemede yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan 8-OHdG ölçümünün, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edildiği bildirilmiştir (129, 131, 135-137). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oksidatif stres için en önemli biyomarkır olup serum, idrar, doku ve hücre örneklerinden belirlenebileceği belirtilmiştir (41, 123). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyesindeki yükselmenin yaşlanma sürecine bağlı olmasının yanında kanser, diyabet ve hipertansiyon gibi pek çok patolojik durumla da ilişkilidir (111, 139).



Şekil 2.5. 8-OHdG'nin moleküler yapısı (111).

Oksidatif DNA hasarının önemini ve mekanizmasını anlayabilmek için yüksek basınçlı likit kromotografisi, gaz kromatografisi ve immunokimyasal yöntemler gibi farklı analiz yöntemleri kullanılmıştır. DNA hasar ürünlerinin spesifik tiplerinin kantitatif analizi için immünosorban yöntemlerden Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kullanılır. ELISA ile 8-OHdG boyanması monoklonal antikorlar kullanılarak yapılır ve düzeyi boyanmanın yoğunluğuna bağlı olarak değerlendirilir (41, 123, 139,140).

2.3. MİKRONÜKLEUS (MN)

Mikronükleus, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozomlardan köken alan, küçük yuvarlak görünümlü ekstra nükleer yapılar olarak tanımlanır (141).

2.3.1. Mikronükleus Oluşum Mekanizmaları

Mikronükleus, kromozom ya da kromatid kırıklarından ya da kromozomların anafazda geri kalmasından oluşur. Mikronükleus oluşumuna oksidatif stres, çeşitli mutajenik ve kanserojenik ajanlar, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki ve DNA tamir mekanizmasındaki hataların neden olduğu saptanmıştır (141, 142).

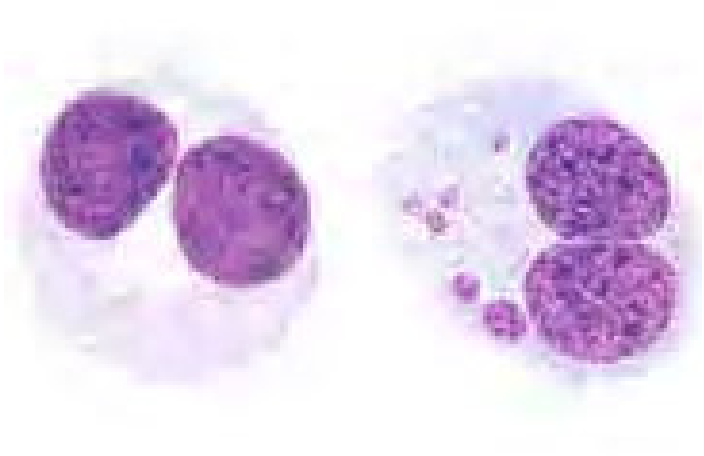
2.3.2. Mikronükleusun Test Olarak Kullanılması

Fenech and Morley (143) mikronükleusun, 1950'lerde bitki hücrelerinde, 1970'lerde Heddle et al. tarafından hayvan hücrelerinde ve sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde geliştirildiğini ifade etmişler, 1980'lerin ortalarında ise kendileri tarafından sitokinez-blok (CBMN) yöntemi olarak geliştirildiğini bildirmişlerdir. Mikronükleus testinin, DNA ya da kromozom seviyesinde lezyonları belirlemek için çeşitli hücre tiplerine uygulanabilen ve yaygın olarak kullanılan bir genotoksisite metodu olduğu belirtilmiştir (31, 137, 141, 143-146). Mikronükleus testi, kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistik analizler de daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları ile yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olarak kabul edilmiştir (147-150).

2.3.3. Sitokinez-Bloke Mikronükleus Sitom (Cytome) Yöntemi

Sitokinez-blok yöntemi (CBMN), sitokalazin-B'nin (cytochalasin-B, cyt-B) kullanımıyla hücre bölünmesinin sitokinez evresinde durdurulması temeline dayalı bir yöntemdir (146, 151-153). Sitokalazin-B, hücre bölünmesinin sitokinez evresinde oluşan kontraktil halkada aktin filamentlerine bağlanıp aktinin polimerize olmasını

engeller ve sitokinez gerçekleşmez ve sonuçta sitoplazma bölünmesi olmadığı için binükleer hücreler ortaya çıkar (154, 155) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Binükleer hücreler

Daha sonra CBMN yöntemi sitom assay yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle de eş zamanlı olarak;

- ✓ Kromozom instabilitesi / genom hasarı
- ✓ Hücre çoğalması
- ✓ Hücre ölümü

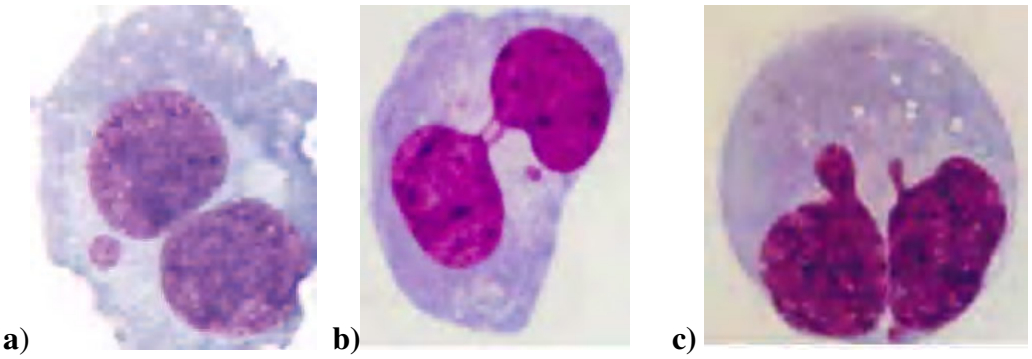
belirlenebilmektedir.

DNA hasarını tespit etmek için; mikronükleus, nükler plazmik köprüler (NPB) ve nükleer bud (NBud) oluşumları değerlendirilir.

Mikronükleus; kromozom kırıkları ve / veya kromozom kayıplarını (anöploidi) gösterir (Şekil 2.7-a).

Nükleoplazmik köprü; hatalı DNA tamirlerini ve/veya telomer uç birleşmelerini gösterir (Şekil 2.7-b).

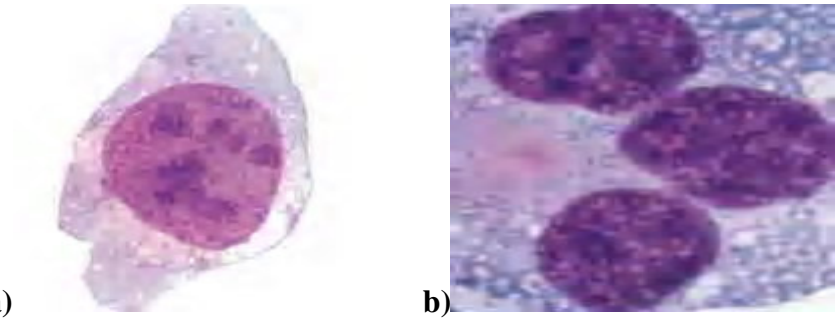
Nükleer bud; gen amplifikasyonlarını gösterir (Şekil 2.7-c) (141).



Şekil 2.7. Binükleer hücrelerde a) Mikronükleus (MN), b) Nükleoplazmik köprü (NPB), c) Nükleer bud (NBUD)

Hücre çoğalmasını belirlemek için; Mononükleer (Şekil 2.8-a), binükleer, multi nükleer hücreler (Şekil 2.8-b) skorlanarak, hücre çoğalma oranları hesaplanır.

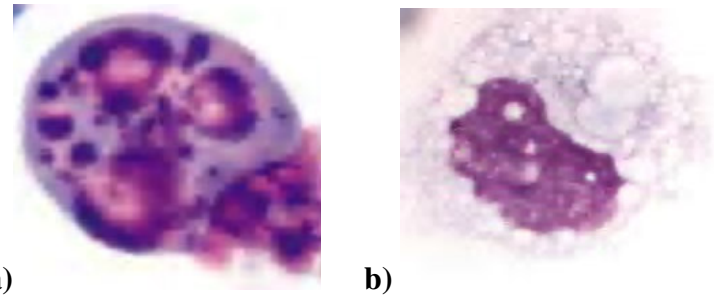
$$NBI = \frac{(1M+2M+3M+4M)}{N}$$



a) **b)**

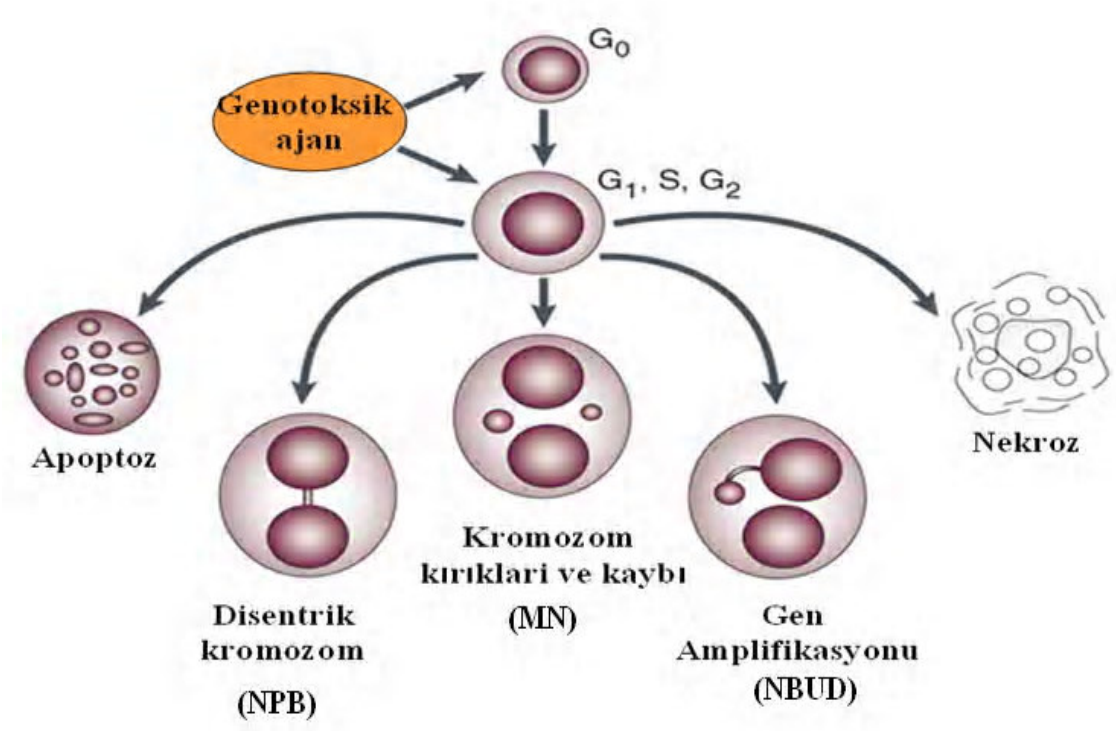
Şekil 2.8. a) Mononükleer hücre, b) Multinükleer hücre

Hücre ölümünü belirlemek için; apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanır (Şekil 2.9-a,b).



a) **b)**

Şekil 2.9. a) Apoptotik hücre, b) Nekrotik hücre



Şekil 2.10. Çeşitli sitotoksik ve genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra, kültüre edilmiş sitokinez-bloke edilmiş hücrelerin olası akibeti (MN: mikronükleus; NPB: nükleoplazmik köprü, NBUD: nükleer bud) (156).

Nükleoplazmik köprülerin (NPB), hücre anafazda iken disentrik kromozomların sentromerleri zıt kutuplara çekilirken oluştuğu, nadir durumlarda da, nükleer membran oluşmadan önce disentrik anafaz köprüleri gözlenebildiği bildirilmiştir. Bu durumun anafaz köprüsünün NPB olarak gözlenmesine olanak sağladığı belirtilmiştir. Bunun yanısıra, DNA iplik kırıklarının hatalı tamirinin de NPB oluşumuna yol açabileceği saptanmıştır. Nükleoplazmik köprülerin oluşumu için bir alternatif mekanizma da telomer kısalmasıyla oluşan (telomer cap proteini kaybı veya telomer yapışma defekti sonucu) telomer uç birleşmeleri olduğu belirtilmiştir (156).

Nükleer budların (NBUD) S fazı sırasında oluştuğu ve morfolojik olarak MN ile aynı karakterde olduğu açıklanmıştır. İstisnai olarak dar veya geniş nükleoplazmik materyalden oluşan bir sap ile çekirdeğe bağlı olduğu bildirilmiştir (156).

Apoptozis ve nekrozis, morfolojik ve kimyasal özelliklerine dayanılarak identifiye edilen iki farklı hücre ölümü formudur. Apoptozis, hücre küçülmesi, kromatin kondenzasyonu, membranda kabarcık (bleb) oluşumu membrana bağlı apoptotik hücrelerde fragmentasyon ile karakterize iken; nekrozis, hücrenin şişmesi, hücre membranının yırtılması ve hücre içeriğinin ekstraselüler boşluğa geçmesi ile karakterizedir (157).

Apoptozis'in zarar görmüş, olgunlaşmamış, otoreaktif ya da fazla hücreleri yok ederek proliferatif dokularda homeostazisi sağlayan genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olduğu ve çeşitli fizyolojik ve dış uyarıların apoptozisi uyardığı belirtilmiştir (158). Kromatin kondensazyonu, nükleer fragmentasyon ve diğer hücreler tarafından fagosite edilen membran bağımlı apoptotik hücrelerin varlığı apoptozisin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu değişikliklerin mikroskobik incelemelerle de gösterilebileceği açıklanmıştır (159, 160).

Hücrelerin, nükleer bölünme indeksinin (NDI), nekroz ve apoptozis oranlarının belirlenmesi, incelenen ajanların sitostatik ve sitotoksik özellikleri hakkında bilgi verir. İnsan lenfositlerinde, NDI aynı zamanda mitojen yanıtların ölçümünü de sağlar (156).

Sitokinez-blok yöntemi, DNA hasarı ve yanlış tamiri, kromozomal instabilite, mitotik anormallikler, hücre ölümü ve sitostaziyi gösteren etkili bir "cytome (Sitom)" yöntemi olarak geliştirilmiş olup (147-150, 159), doğruluğu açısından, genom hasarı gibi patolojik durumların araştırılmasında güvenilir bir yöntem olması yönüyle, yaygın kullanılan bir teknik olmuştur (141, 147-150).

Sitokinez-Bloke Mikronukleus Sitom Tekniğinin Kullanım Alanları;

- Çevresel ve mesleki etkileri değerlendirme,
- Yaş, sigara kullanımı, alkol tüketimi, cinsiyet gibi biyomonitoring çalışmaları,
- DNA hasarı bilinen hastalıklarda hasar düzeyini tespit etme çalışmaları,
- Nutrigenomiks ve farmakogenomiks gibi çeşitli araştırma alanları,
- İn vivo genotoksinlere maruz kalma,
- İn vitro genotoksisite çalışmaları,
- Artmış hamilelik komplikasyonları,

- Kardiyovasküler hastalıklar,
- Kanser riski yüksek olan hastalıklarda bir belirteç olarak kullanılır.

2.4. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI ÜZERİNE KROMUN ETKİSİ

Son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan Cr'un strese olan metabolik yanıtı değiştirdiği; stres altındaki hayvanlarda Cr'un etkilerinin daha belirgin olduğu bildirilmektedir (1, 14, 97).

Pek çok çevresel faktörün yanısıra endojen faktörler de organizmada serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır (161). Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur (103, 104, 118, 162).

Çeşitli çalışmalarda kromun antioksidan savunma üzerine etkileri incelenmiş ve kromun GPx ve Cu-Zn süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmadığı (78), ancak monositlerin endotel hücrelerine adhezyonunu baskıladığı bildirilmiştir (163). Jain and Kanan (164) tarafından U937 monosit hücre kültürleri ile yapılan bir *in vitro* çalışmada yüksek düzeyde glikoza bağlı olarak oluşan oksidatif stresin önlenmesinde $CrCl_3$'ün etkisi araştırılmış ve insülinin etkisini ve duyarlılığını baskılayan bir sitokin olan TNF-α salınımındaki artışın Cr ile inhibe edildiği belirlenmiştir. Eritrositlerde de yüksek düzeyde glikoza bağlı olarak gelişen protein glikolizasyonu sonucu oluşan oksidatif stresin $CrCl_3$ ile baskılandığı açıklanmıştır (165) Krom klorürün lipid peroksidasyonunu baskılayarak ROT oluşumunu engellediği (54), sıcaklık stresine maruz bırakılan bıldırcınlarda $CrCl_3$'ün artan MDA düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir (96, 166). Krom pikolinat bünyesinde yeme katılan Cr'un; 5 ve 10 mg/kg düzeylerinin obez ratlarda oksidatif stres ve yangı oluşumunu azalttığı (167) bildirilmesine karşın, 100 ve 250 mg/kg düzeylerinin diyabetik obez ratlarda DNA hasarına yol açmadığı ortaya konulmuştur (41).

Fizyolojik konsantrasyonlardaki CrPic'ın askorbik asit ve thiol gibi biyolojik redüktanlarla Cr^{+2} bileşiklerine indirgendiği, havayla oksidasyona duyarlı oldukları için bu bileşiklerin DNA harabiyetine yol açan hidroksil radikallerini ($HO^{\cdot}$) oluşturduğu ileri sürülmektedir (39). Krom pikolinatın 50-260 ppb aralığındaki fizyolojik konsantrasyonlarının, DNA ayrılması ve olası diğer oksidatif hasarlara sebep olan ROT oluşumuna yol açtığı belirtilmektedir (38, 42, 54). Krom pikolinatın 40000 ppb'den

daha yüksek düzeyde kullanımının $HO^{\cdot}$ oluşumunu ve hücre hasarını tetikleyeceği bildirilmiştir (25, 37, 38).

Kromun DNA hasarı üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların sonuçları arasında uyumsuzluklar bulunmaktadır. Buzağı timusunda yapılan bir çalışmada $CrCl_3$ gibi iz metallerin 8-OHdG uyarımını etkilemediği belirlenmiştir (168). Chang et al. (169) tarafından Yeni Zelanda tavşanlarında yapılan çalışmada, serbest oksijen radikal düzeyindeki azalmaya paralel olarak karaciğerde 8-OHdG düzeyinin düştüğü belirlenmiştir.

Stearns et al. (25)'nın Chinese hamster ovaryumlarında yapmış oldukları çalışmada, çözünür formda CrPic'ın 0,025; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 mM, partiküler formda 4,0; 8,0; 40 µg/cm2; pikolinik asit formunda ise 1,0; 1,5; 2,0 mM dozları kullanılmıştır. Krom pikolinat'ın hem çözünür hem de partiküler formunun klastojenik olduğu ve klastojen etkinin, çözünür CrPic için 50 µM ile 1,0 mM ve partiküler form için 40 $\mu g/cm^2$'nin üzerindeki dozlara bağlı olarak geliştiği belirtilen çalışmada toksisite sonucu hücre döngüsünün ertelenmesi ve metafazın azalması nedeniyle 2,0 mM'ün üzerindeki pikolinik asit düzeylerinin incelenmediği açıklanmıştır. Shirivastava et al. (28) tarafından insanların dermal fibrokistleri ile yapılan çalışmada 1, 10, 50 ve 100 µM düzeylerinde kullanılan CrPic, $CrCl_3$, $[Cr(salen)(H_2O)_2]^+$, $[Cr(edta)(H_2O)]-$, $[Cr(en)_3]^{3+}$, $[Cr(ox)_3]^{3-}$gibi üç değerlikli Cr komplekslerinin nükleer düzeyde sitotoksik olabileceği belirtilmiştir. İmamoğlu ve ark. (31)'nın yaptığı çalışmada da günlük 400 µg CrPic'ın lenfositlerde MN sıklığını arttırdığı, 200 µg CrPic verilen buzağı lenfositlerinde ise bu etkinin görülmediği belirlenmiştir. Jana et al. (170) da periferal lenfosit kültüründe CrPic etkisini araştırdıkları çalışmada, 5, 25, 50 ve 100µM CrPic uygulamasının ROT oluşumunda hafif bir artışa yol açtığını, 300 µM pikolinik asitin ise kontrollere göre 1.6 kat artışa neden olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırıcıların diğer çalışmasında 100µM CrPic uygulamasının hücre içi ROT artışına yol açtığı ve mitokondrial membran potansiyelinin kaybolduğu, uygulamanın stoplazmik tomurcuk (bleb) oluşumuna ve stoplazmik sızıntıya yol açtığı belirlenmiştir (157).

Üç gün 2500 mg/kg CrPic verilen F344 ratlarından alınan periferal kan örneklerinde ve on üç hafta boyunca 50000 mg/kg CrPic içeren diyetle beslenen B6C3F1 faresinin periferal kan eritrositlerinde yapılan çalışmalar sonucu mikronükleus sıklığında artış olmadığı belirtilmiştir (171). Stout et al. (49), 2000, 10000 ve 50000 ppm gibi yüksek

düzeylerde CrPic'ın dişi ratlarda ve dişi ve erkek farelerde karsinojenik etki göstermediğini açıklamışlardır. NanoCrPic ile yapılan bir çalışmada da 300-1000 ppb nanoCrPic'ın ratlarda toksik etki oluşturmadığı bildirilmiştir (50). Diğer taraftan Stearns et al. (25) Cr^{+3} 'ün Chinese hamster ovaryum hücrelerinde kromozom hasarına neden olduğunu, pikolinik asitin tek başına uygulanmasında ise klastojenik olduğunu bildirmişlerdir. Whittaker et al. (36) tarafından *Salmonella typhimurium* ve L5178Y fare de CrPic ve onun komponeni pikolinik asitin ve $CrCl_3$'ün lenfositlerde mutasyon, hücresel toksisite ve mutajenite üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada ne CrPic ne de $CrCl_3$'ün bakterilerde mutajenik tepkiye yol açmadığı, ancak L5178Y farede nispeten toksik olmayan dozlarda mutajenik tepkiye yol açtığı bildirilmiştir. Manygoats et al. (26) tarafından yapılan çalışmada, CrPic'ın CHO AA8 hücrelerinde morfolojik değişikliğe sebep olduğu, apoptosiz artışının da CrPic seviyesindeki artışa paralel olduğu saptanmıştır. Buzağılarda yapılan bir çalışmada da, Cr miktarının artışı ile fragmente ve düzensiz şekilli nükleus oranında artış olduğu, apoptotik hücrelerde de doza bağlı bir artış olduğu bildirilmiştir (31).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Demirbaş Malzemeler

1. ICP/MS (Agilent 7500a)
2. ELISA Cihazı (µQuant, Bio-Tek Marka)
3. Sonikatör (Bandelin, Sonopuls HD 2070)
4. Soğutmalı santrifüj (Hettich, Universal 32R)
5. Buz makinası (Scotsman, AF100)
6. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
7. Su banyosu (Thermal)
8. Vorteks (Velp Scientifica, Janke & Kunkel VF2)
9. Mikrodalga cihazı (Berghoff Speedwave)
10. Mikroskop (Zeiss Primo Star ve Nikon Labophot 2)
11. Santrifüj (ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
12. Hassas terazi (Kern S 2000 ve Ohaus Pioneer)
13. Derin dondurucu
14. Buzdolabı
15. Dengeleme terazisi
16. Otomatik pipetler (Socorex, Tek kanallı ve Çok kanallı)
17. Fotomikroskop (Leica DM 2500)

Sarf Malzemeler

1. 8-OHdG ELISA Kiti (NWK 8-OHdG 02, Nortwest Life Science Specialtist and LLC)
2. TBARS ELISA Kiti (Cayman, 10009055)
3. RIPA buffer (Cayman, 10010263)
4. Hazır Medyum, (Biological Industries, B-01-198-1B) Peripheral Blood Karyotyping Medium (Complete culture medium w/o phytohemagglutinin),
5. Fitohemaglutinin (Biological Industries, B1-12-006-1H)
6. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
7. Dimetil sülfoksit, DMSO (Merck)
8. Giemsa (Merck, 5400512)
9. KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
10. $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Merck, K1690176)
11. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
12. Metanol (Merck, 502K05275408)
13. Ksilol (Merck, 207K037553)
14. Entellan® (Merck, 640171987)
15. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
16. KCL (Merck, 340TA611835)
17. Alkol (%96'lık Tekel)
18. Heparinli kan alma tüpü
19. Kan alma tüpü (Vakumlu)
20. Distile su
21. Porttüp
22. Çeşitli cam malzemeler
23. Ependorf tüp
24. Konik tabanlı 10 ml'lik steril kültür tüpü
25. Enjektör
26. Çeşitli ebatlarda puarlar

27. Pastör pipeti
28. Filtre Kağıdı (Whatman Filter Papers 125 mm)
29. Lam (İsolab, 76x26 mm, 1/3 buzlu)
30. Lamel (İsolab, 24x32 mm)

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesi'nden (EÜ HADYEK) onay alındı (10/67 nolu, 11.08.2010 tarihli). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edilen 16 haftalık 40 Yeni Zelanda tavşanı, canlı ağırlıkları yönünden istatistiki fark olmayan ($P>0,05$) ve her birinde 10 tavşan (5 dişi, 5 erkek) bulunan 4 gruba ayrıldı.

3.1.2. Barınma ve Yetiştirme Koşulları

Tavşanlar, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nin araştırma ünitelerinde bulunan 48x61x46 cm ebatlarındaki polikarbonat kafeslerde, kaba talaş altlıklarda, araştırma merkezinin sahip olduğu konvansiyonel deney hayvanı barındırma şartlarında (kontrollü sıcaklık 21±2 ^{o}C, nem % 50±5, hava değişimi saatte 12 devir ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık), her birinde 2'şer hayvan bulunacak şekilde barındırıldı.

3.1.3. Deneme Düzeni ve Hayvanların Beslenmesi

Deneme başında tüm hayvanlar tartılarak ortalama canlı ağırlıklar benzer olacak şekilde gruplar oluşturuldu. Birinci gruptaki hayvanlara (kontrol grubu), tüm deneme gruplarına uygulanan miktar olan 2 ml distile su, II. gruptaki hayvanlara $CrCl_3.6H_2O$ formunda 20 mg Cr, III. gruptaki hayvanlara CrPic formunda 200 µg Cr ve IV. gruptaki hayvanlara CrPic bileşiğinin içerdiği miktar kadar (günlük 1400 µg) pikolinik asit; gavaj yöntemiyle 50 gün verildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deneme grupları.

Deneme grupları	**Uygulama**	**Hayvan sayısı**
Grup I	Kontrol (distile su)	10
Grup II	20 mg $CrCl_3$	10
Grup III	200 µg CrPic	10
Grup IV	1400 µg $C_6H_5NO_2$	10

Hayvanlar günlük besin madde ihtiyacını karşılayacak olan ticari pelet yemle beslendi. Hayvanlara verilen yemin tarafımızdan yapılan analizinde 1.648 ppm Cr içerdiği saptandı (Tablo 3.2). Hayvanlara deneme boyunca su ve yem *ad libitum* verildi.

Tablo 3.2. Tavşan yeminin besin madde miktarları.

Kuru madde (en az) (%)	88,0	Vit B_{12} (en az) (mcg/kg)	20.0
Ham protein (en az) (%)	17,0	Vit K_3 (en az) (mg/kg)	2.0
Ham selüloz (en çok) (%)	16,0	Kalsiyum (en az-en çok) (%)	0,9-1,1
Ham Kül (en çok) (%)	9,0	Sodyum (en az-en çok) (%)	0,2-0,4
HCl de çözünmez kül (%) (en çok)	1,0	Fosfor (en az) (%)	0,60
Vit A (en az) (IU/kg)	2000	NaCl (en çok) (%)	1,00
Vit D_3 (en az) (IU/kg)	3000	Lizin (en az) (%)	0,75
Vit E (en az) (mg/kg)	50	Metiyonin (en az) (%)	0,40
Vit B_2 (en az) (IU/kg)	5	Sistin (en az) (%)	0,30
Cr (ppm) (analiz ile saptanan)	1,648	Metabolik enerji (en az) (Kcal/kg)	2500

3.1.4. Örneklerin Toplanması

Kan örneklerinin toplanması ve muhafazası: Denemenin 25. ve 50. günlerinde hayvanların V. auricularis caudalis'inden; plazmada 8-OHdG seviyesinin ve kültüre edilmiş lenfositlerde sitokinez bloke mikronükleus sitom (CBMN cyt) yöntemi parametrelerinin belirlenmesi amacıyla antikoagülantlı (heparinli) kan alma tüplerine 5 ml kan örneği alındı. Plazma 8-OHdG düzeyinin belirlenmesi amacıyla kan örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirilip 1,300 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılarak analizler gerçekleştirilinceye kadar -80^{o}C'de muhafaza edildi. Sitokinez bloke mikronükleus sitom (CBMN cyt) yönteminde, hayvanlardan heparinli tüplere alınan kan örnekleri hücre kültür medyumu içeren kültür tüplerine eklenerek 72 saatlik tam kan kültürüne bırakıldı.

Antikoagülantsız tüplere alınan 2-3 ml kan örneği oda sıcaklığında 1 saat tutulup 1,300xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak analizler gerçekleştirilinceye kadar, serum MDA analizlerinde kullanılacak örnekler -80^{o}C'de, serum krom analizinde kullanılacak örnekler -20^{o}C'de muhafaza edildi.

Doku örneklerinin toplanması: Doku MDA düzeyinin belirlenmesi için deneme sonunda tavşanlardan alınan karaciğer örnekleri plastik torbalara toplanarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi ve hemen doku MDA ölçümü prosedürü gereği homojenize edilip süpernatantları ayrıldıktan sonra -80^{o}C'de muhafaza edildi.

Yem örneklerinin toplanması: Yemin kimyasal analizleri için yemin beş farklı yerinden alınan yem örnekleri harmanlandı ve bu yem örneklerinde besin madde analizleri gerçekleştirildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Canlı Ağırlık Değişiminin Belirlenmesi

Elli günlük deneme süresi içinde, haftada bir hayvanlar 12 saat aç bırakıldıktan sonra tartılarak canlı ağırlıkları kaydedildi.

3.2.2. Yem Tüketiminin Belirlenmesi

Haftada bir yapılan ölçümlerle grupların yem tüketimi hesaplandı.

3.2.3. Yem Analizleri

Denemede kullanılan yemin besin madde miktarları A.O.A.C'de (172) bildirilen analiz metodlarına göre belirlendi. Metabolik enerji düzeyleri ise Carpenter and Clegg (173) göre hesaplandı.

3.2.3.1. Yemin krom düzeyinin belirlenmesi

Yemin krom analizi, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERÜTAUM)'nde gerçekleştirildi.

Yemden 250 mg alınarak mikrodalga çözünürleştirme cihazının sıcaklık ve basınca dayanıklı teflon hücresine yerleştirilip üzerine % 65'lik HNO_3 den 5 ml ilave edildi. Yemde oluşabilecek olası gaz çıkışı ve köpüklenmenin önlenmesi için örnek en az 20 dakika mikrodalga çözünürleştiriciye yerleştirilmeden ağzı açık bir biçimde bekletildi. Yem üzerine kapak kapatılarak uygun sıcaklık programı uygulandı. Çözünürleştirme işlemi bittikten sonra elde edilen berrak çözelti 10 ml'lik balon jojeye alınarak hacmi çift distile su ile tamamlandı ve numune ölçüme hazır hale getirildi. Ölçüm öncesi analizi yapılacak elementi içeren artan derişimlerde standartlar hazırlandı (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppb). Cihaz (Agilent 7500a series ICP/MS) analize hazır konuma geldikten sonra cihazın performansını test etmek amacı ile içeriğinde İtriyum (Y), Lityum (Li), Kobalt (Co), Tallium (Tl) ve Erbiyum (Er) bulunan tune çözeltisi ile tune ayarı yapıldı. Bu elementlerin sayım değerleri bu ayar esnasında kontrol edildi ve bu basamaktan sonra cihaz analize hazır hale geldi. Hazırlanan standartlar cihaza tanıtıldı. Kalibrasyon doğrusundaki sapmaları düzeltmek amacı ile periyodik tabloyu temsil eden Berilyum (Be), Skandiyum (Sc), Radyum (Ra), Bizmut (Bi) elementlerini içeren iç standartlar analiz esnasında cihaza verildi. Numuneden, istenilen element değerleri okunarak, sonuçlar ppb cinsinden elde edildi.

3.2.4. Kan Analizleri

3.2.4.1. Serum ve doku malondialdehit düzeylerinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan μQuant Bio-Tek Marka ELISA cihazında, ticari kit (Cayman, USA) kullanılarak belirlendi (115).

Prensip

Metodun prensibi iki molekül tiyobarbütürik asit (TBA)'in bir molekül MDA ile asit ortamda sitokiyometrik olarak reaksiyona girerek pembe renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır.

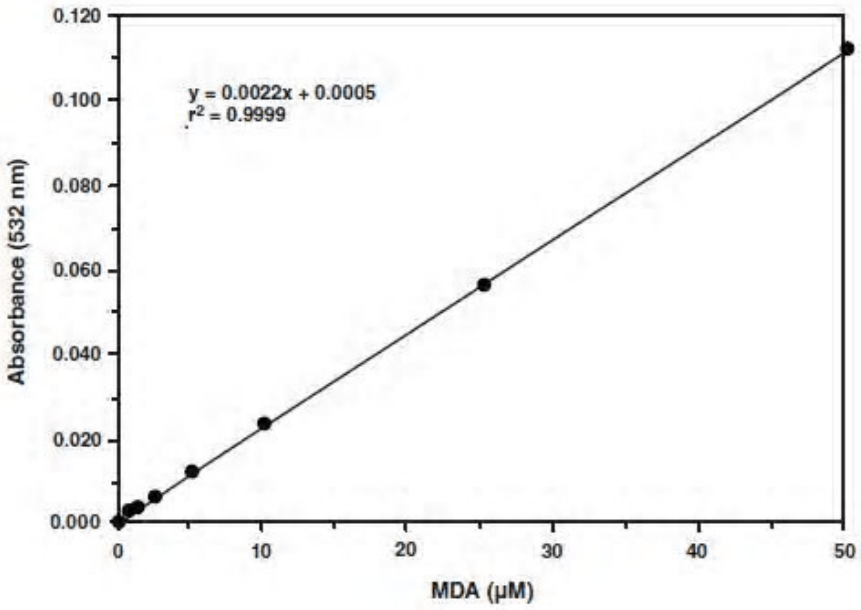
Ayıraç

Serum ve doku MDA düzeylerinin saptanması için thiobarbütirik asit, TBA asetik asit, TBA sodyum hidroksit, TBA sodyum lauril sülfat (SOD), renk reaktifi ile konsantrasyonları 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50 µM/L olan standart solüsyonları kullanıldı.

İşlem

Serum MDA düzeyinin belirlenmesinde; standartlar için hazırlanan tüplere 100'er µL standartlardan, örnekler için hazırlanan tüplere de 100'er µL örneklerden konuldu. Tüplerin tamamına 100 µL SDS ilave edildikten sonra vorteks ile karıştırıldı. Ardından her bir tüpe 4 ml renk reaktifi eklendikten sonra tüplerin ağzı kapatılarak kaynayan suda bekletildi. Bir saat sonunda tüpler kaynar sudan alınarak 10 dak. buz içerisinde tutuldu. İnkübasyon sonrası tüpler $+4^0$C 1,600 x g'de 10 dak. santrifüj edilip 30 dak. oda ısısında bekletildi. Hazırlanan süpernatantlardan 150'şer µL alınarak ELISA plakalarının üzerinde standartlar ve örnekler için belirlenen ikişer kuyucuğa aktarıldı. Elde edilen organik fazların absorbansları 530-540 nm dalga boyunda ölçüldü, standart absorbansları ölçülerek standart eğrisi çizildi ve örneklerin absorbansları standart eğrisi ile karşılaştırılarak MDA düzeyi belirlendi (Şekil 3.1).

Doku MDA düzeyinin belirlenmesinde, tartılan 25 mg karaciğer dokusu 1.5 ml'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 250 µL proteaz inhibitörlü RIPA tampon ilave edildi ve buz altında 40 V'da 15 saniye sonikatörde parçalandı. Örnekler $+4^0$C'de 1,600 x g'de 10 dak. santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatantlara serum MDA için uygulanan prosedür uygulanarak doku MDA düzeyleri belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Malondialdehit'in Standart Kalibrasyon Eğrisi.

3.2.4.2. Plazma 8-hidroksi 2'-deoksiguanosin düzeyinin belirlenmesi

Plazma 8-OHdG düzeyleri, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ELISA cihazında (µQuant Bio-Tek), ticari kit (Northwest, Washington) kullanılarak belirlendi (111). Kit prosedürüne göre ölçme işlemi yapıldı.

Yöntem

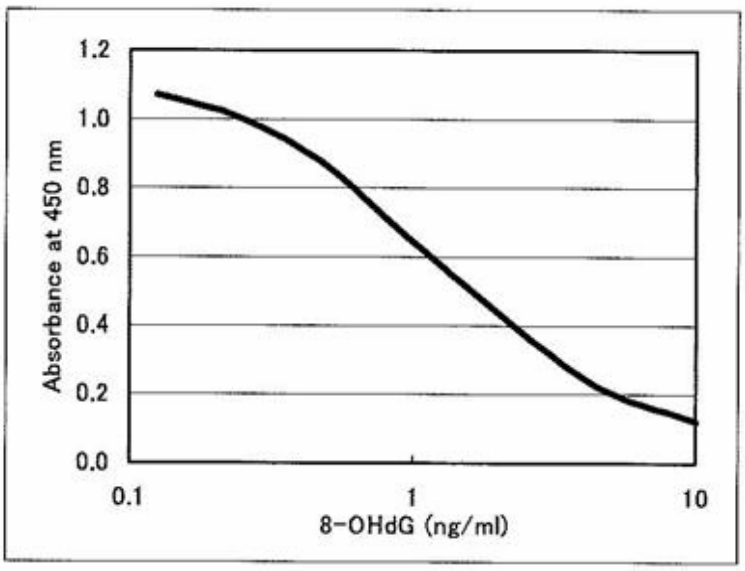
Bu metod 8-OHdG ile 8-OHdG HRP konjugatının ortamda kısıtlı miktarda bulunan 8-OHdG monoklonal antikor için yarışması esasına dayanmaktadır. Ortamdaki 8-OHdG miktarı değişirken, 8-OHdG eser miktarı sabit kalmakta ve ortamdaki serbest 8-OHdG miktarının oranıyla ters orantılı olarak bağlanma göstermektedir.

Ayıraç

Plazma 8-OHdG düzeyini belirlemek için 8-OHdG standart, primer antikor, primer antikor tampon (PBS), sekonder antikor, sekonder antikor tampon (PBS), 3,3',5,5'tetrametilbenzidin (TMB) Substrat, dilüsyon tampon (H_2O_2/sitrat/PBS), yıkama tamponu (konsantre PBS) ve stop solüsyonu (fosforik asit) kullanıldı.

İşlem

Reaktiflerin tamamı oda ısısına getirildi. Plaka da standartların ve örneklerin konulacağı kuyucuklar belirlendi, 50 µL standartlardan ve örneklerden kendileri için belirlenen kuyucuklara eklendi. Blank (kör) için ayrılan kuyucuğa da 50 µL PBS eklendi. Sulandırılmış primer antikordan blank haricindeki bütün kuyucuklara 50 µL ilave edilip, içeriğin düzgün karışmasını sağlamak için plaka hafifçe çalkalandı. Ağız kısmına kapak yapıştırılan plaka bir gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. İçeriği boşaltılan kuyucukların her birine 250 µL yıkama tamponu ilave edilip, yıkamadan iyi sonuç almak için plaka yavaşça sallandıktan sonra içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından sulandırılmış sekonder antikordan her bir kuyucuğa 100 µL eklenip, içeriğin karıştığından emin olmak için yavaşça çalkalandı. Yapışkan bant ile ağzı kapatılan plaka oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaka içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Plakanın her kuyucuğuna 100 µL TMB substrat eklendikten sonra hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 100 µL stop solusyonu eklenerek 450 nm'de absorbansı okundu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 8-Hidroksi 2'-Deoksiguanosin'in Standart Kalibrasyon Eğrisi.

3.2.4.3. Serum krom analizi

Yemin krom analizi, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERÜTAUM)'nde gerçekleştirildi.

Serumlardan 1'er ml alınarak mikrodalga çözünürleştirme cihazının sıcaklık ve basınca dayanıklı teflon hücrelerine yerleştirilip üzerine % 65'lik HNO_3 den 5 ml ilave edildi, olası gaz çıkışları ve köpüklenmenin önlenmesi için en az 20 dakika numuneler mikrodalga çözünürleştiriciye yerleştirilmeden ağızları açık bir biçimde bekletildi, daha sonra kapakları kapatılarak uygun sıcaklık programı uygulandı (Tablo 3.3). Çözünürleştirme işlemi bittikten sonra elde edilen berrak çözeltiler 10 ml'lik balon jojelere alındı ve hacimleri çift distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak örnekler ölçüme hazır hale getirildi. Ölçüm öncesi analizi yapılacak elementi içeren artan derişimlerde standartlar hazırlandı (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppb). Cihaz (Agilent 7500a series ICP/MS) analize hazır konuma geldikten sonra cihazın performansını test etmek amacı ile tune çözeltisi ile tune ayarı yapıldı, bu çözeltide bulunan elementler İtriyum (Y), Lityum (Li), Kobalt (Co), Tallium (Tl), Erbiyum (Er)'dur. Bu elementlerin sayım değerleri bu ayar esnasında kontrol edildi ve bu basamaktan sonra cihaz analize hazır hale geldi. Hazırlanan standartlar cihaza tanıtıldı. Kalibrasyon doğrusundaki sapmaları düzeltmek amacı ile periyodik tabloyu temsil eden Berilyum (Be), Skandiyum (Sc), Radyum (Ra), Bizmut (Bi) elementlerini içeren iç standart analiz esnasında cihaza verildi. Numunelerden istenilen element değerleri okunarak, sonuçlar ppb cinsinden elde edildi.

Tablo 3.3. Yem ve serumda Cr analizi için ICP/MS'de uygulanan sıcaklık ve basınç değerleri.

Enstrümental Şartlar	**Basamaklar**	
	1	2
Sıcaklık (°C)	160	190
Basınç [bar]	40	40
Güç (%)	80	90
İstenilen Sıcaklık ve Basınca Ulaşma Süresi [dak.]	5	1
Bekleme Süresi [dak.]	5	10

3.2.4.4. Sitokinez bloke mikronükleus sitom (cytome) yöntemi

Sitokinez bloke mikronükleus sitom (CBMN cyt) yönteminde, hayvanlardan heparinli tüplere 4 ml kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden 0.4-0,5 ml hücre kültür medyumu içeren kültür tüplerine ekildi ve 72 saatlik tam kan kültürü yapıldı. Kültürün 44. saatinde sitokalazin-B ilave edilerek binükleer hücrelerin oluşması sağlandı (145).

Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Sitoklazin B: 1 mg Sitoklazin B (cyt-B) (Sigma, 6762), 1 ml dimetil sülfoksitte (DMSO) ve 4 ml medyum (Biological Industries katolog no Hams F10) çözdürüldü.

Hipotonik solüsyonu: 1.864g KCl, 250 ml distile su ile çözdürülerek 0,1 M hipotonik solüsyonu hazırlandı.

Fiksatif: metanol: glasial asetik asit 3:1 oranında olacak şekilde taze hazırlandı soğutularak kullanıldı.

Giemsa boya solusyonu: Sorenson boya tamponu (pH=7.0): 5.26 g KH_2P0_4 ve 8.65 g $Na_2HP0_4.2H_2O$ 1000 ml distile suda çözdürüldü. 94 ml Sorenson boya tamponu üzerine 6 ml Giemsa boyası eklenerek % 6'lık Giemsa boyası hazırlandı.

Kültür ortamının (medyum) hazırlanması

Kültür için kullanılan medyum: Laminar air flow içerisinde 100 ml'lik medyum içine 2,5 ml fitohemaglutin (mitojen) eklenip, elle yavaş bir şekilde bir kaç kez karıştırılarak hazırlandı. Bu medyumdan 5'er ml alınarak vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine konuldu ve 10-15 dakika laboratuarda bekletildikten sonra -20 ºC'ye kaldırıldı.

Kültür tekniği: İçerisinde 5 ml medyum bulunan kültür tüpleri, önceden 37°C'ye getirildi. Hayvanlardan alınan kan örneklerinden 0.4 ml kültür tüplerine ilave edildi. Tüplerin üzerine tavşanların numaraları yazıldı ve her tavşan için 2 tüpe ekim yapıldı yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra, 37°C'lik etüvde 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 44. saatinde binükleer hücre elde etmek için 75 µl (final konsantrasyonu: 3µg/ml) cyt-B ilave edildi.

Kültürün sonlandırılması: 72 saat'lik inkübasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj yapıldı.

- Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
- Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1 M hipotonik solusyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
- Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 6 dakika 1200 dev/dak santrifüj edildi. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glasial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 6 dakika 1200 dev/dak santrifüj yapıldı.
- Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 6 dakika 1200 dev/dak santrifüj edildi.
- Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı iki kez yıkama yapıldıktan sonra preparatlar hazırlandı.

Preparatların hazırlanması, boyanması ve saklanması: Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar -20 ^{0}C'de bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetleme yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1-2 cm yukarıdan) 9-10 damla damlatıldı. Lamlara hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her bir tavşan için, bir kültür tüpünden 2 tane olmak üzere toplam 4 preparat hazırlandı.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan %6'lık Giemsa boyası ile 8 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

Preparatların incelenmesi ve sitokinez bloke mikronükleus sitom (Cyt) yöntemi parametrelerinin değerlendirilmesi

- Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Zeiss Primo Star) X40 büyütmede incelendi.
- ***DNA hasarını belirlemek için;*** 1000 binükleer hücre sayıldı ve bulunan MN, NBUD ve NPB sayıları kaydedildi.
- ***Hücre çoğalması oranını belirlemek için;*** 1000 mononükleer hücre sayılırken bulunan binükleer, multi nükleer hücreler skorlandı ve NDI formülü (NDI= (M1+ 2 M2+ 3 M3+ 4 M4) / N) kullanılarak nükleer bölünme indeksi hesaplandı.
- ***Hücre ölümünü değerlendirmek için;*** 1000 mononükleer hücre sayılırken gözlenen Apoptotik ve nekrotik hücreler skorlandı.

MN, NBUD, NPB ve NDI frekansı, Apoptotik ve nekrotik hücre sayısı %'de olarak hesaplandı.

DNA hasarı (MN, NPB ve NBUD) göstergeleri için sayma kriterleri

Mikronükleus kriterleri;

a) MN'ların çapı, genellikle ana çekirdeğin ortalama çapının 1/16 ve 1/3'ü arasında olmalıdır.

b) Mikronükleuslar ana çekirdekle birleşmiş veya bağlantılı olmamalıdır.

c) Mikronükleuslar ana çekirdeğe temas edilebilir ancak üstüne binmiş olmamalıdır.

d) Mikronükleuslar genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boyanmalıdır (156).

Mikronükleus içeren BN hücre örneği Şekil 3.3. (e)'de gösterilmiştir.

Nükleoplazmik köprüleri sayma kriterleri;

a) Nükleoplazmik hücredeki çekirdeğin boyutunun ¼' ünü geçmemelidir.

b) Nükleoplazmik köprüler ana çekirdek ile aynı boyanma özelliklerine sahip olmalıdır.

c) Nadiren bir BN hücrede birden fazla NPB gözlenebilir.

d) Nükleoplazmik köprü içeren bir BN hücre bir ya da daha fazla MN içerebilir.

e) Bir yada daha fazla NPB içeren BN hücre, MN içermeyebilir (156).

Nükleoplazmik köprü içeren BN hücre örneği Şekil 3.3. (f)'de gösterilmişti

Nükleer Bud sayma kriterleri;

a) Nükleer budlar, MN'lara benzer görünümde olup NBUD'un çapından daha dar bir köprü veya çok daha ince bir köprü ile çekirdeğe bağlı olmalıdır.

b) Nükleer budlar, MN ile aynı boyanma yoğunluğuna sahip olmalıdır (156).

Nükleer budlar içeren BN hücre örneği Şekil 3.3.(g)'de gösterilmiştir.

Bir (mononükleer), iki (binükleer), üç (trinükleer) ve dört (tetranükleer) çekirdekli hücreleri sayma kriterleri ve Nükleer Bölünme İndeksi'nin (NDI) hesaplanması:

a. Bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücreler, bütünlüğünü koruyan bir sitoplazma ile normal çekirdek morfolojisi gösteren hücreler olmalıdır.

b. İki çekirdekli veya çok çekirdekli hücreler bir veya daha fazla NPB içerebilir veya içermeyebilir. Yine bu hücreler bir veya daha fazla MN veya NBUD içerebilir veya içermeyebilir (156).

Nükleer Bölünme İndeksi, Eastmond and Tucker (174) metoduna göre hesaplandı.

Bir, 2, 3 ve 4 çekirdek içeren hücrelerin frekansını belirlemek için 500/1000 canlı hücre sayıldı ve NDI= (M1+ 2 M2+ 3 M3+ 4 M4) / N formülü kullanılarak NDI hesaplandı.

M1-M4; 1-4 çekirdek içeren hücrelerin sayısını belirtir ve N, hesaplanan toplam canlı hücre sayısını belirtir. En düşük NDI değeri olasılıkla 1.0'dır. Sitokinez-blok periyodu süresince bölünme başarısız olursa ve bundan dolayı tamamı mononükleer kalırsa bu durum oluşur. Eğer tüm canlı hücreler bir nükleer bölünmeyi tamamlar ve bundan dolayı hepsi binükleer olursa NDI değeri 2.0'dır. Eğer sitokinez-blok fazı boyunca birden fazla nükleer bölünmeyi tamamlayıp ve bundan dolayı 2'den fazla çekirdek içeren canlı hücrelerin oranı fazlaysa, bu durumda NDI değeri 2'den fazla olabilir. Örneğin, eğer canlı hücrelerin %50'si iki çekirdekli, % 10'u üç çekirdekli ve % 10'u dört çekirdekli ise NDI değeri 2.2'dir (156).

Bir (mononükleer), iki (binükleer), üç (trinükleer) ve dört (tetranükleer) çekirdekli hücre örnekleri sırayla Şekil 3.3. (a), (b), (c), (d)'de gösterilmiştir.

Apoptotik ve Nekrotik hücreleri sayma kriterleri

Apoptotik hücre için;

a) Erken Apoptotik hücreler, çekirdek içinde kromatin yoğunlaşmasının varlığı ve bütünlüğünü koruyan sitoplazma ve çekirdek membranı ile ayırt edilebilir.

b) Geç Apoptotik hücreler, bütünlüğünü koruyan sitoplazma ve sitoplazmik membran içinde daha küçük nükleer cisimcikleri oluştururlar.

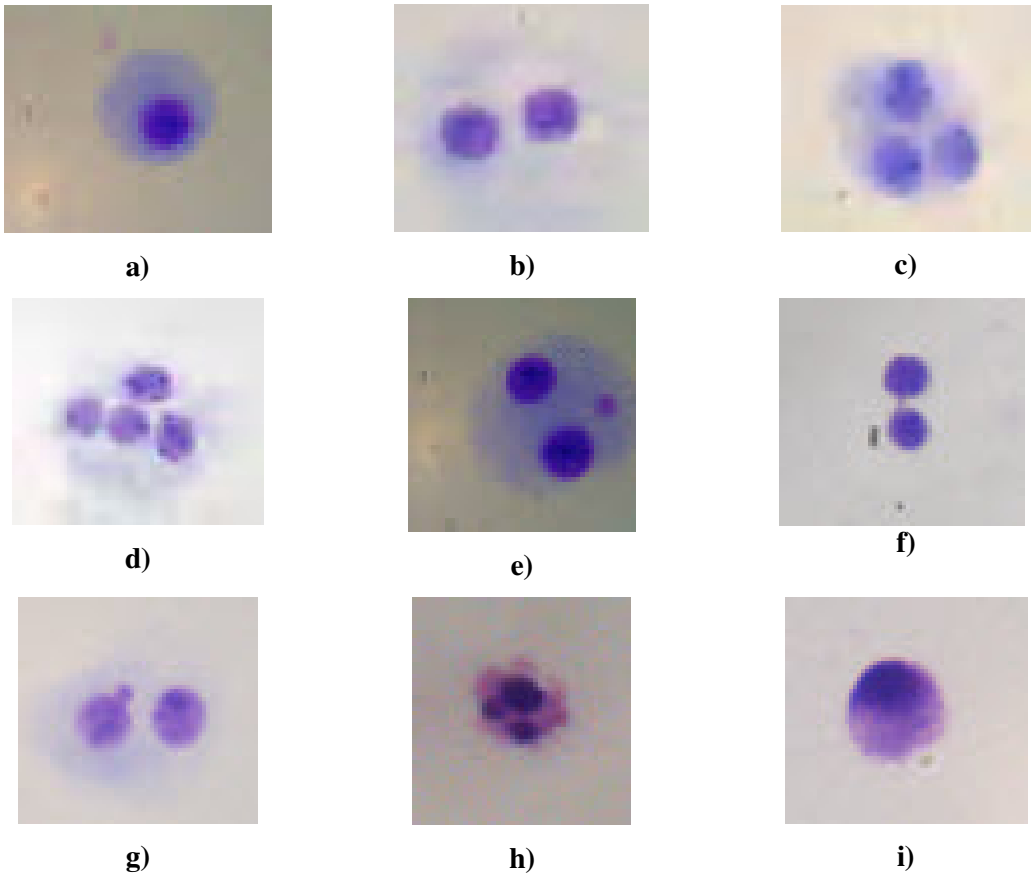
c) Her iki Apoptotik hücrede bu nükleer cisimcikleri, sitoplazma ve çekirdek daha yoğun boyanır (Şekil 3.3. (h)) (156).

Nekrotik hücre için;

a) Erken nekrotik hücreler, soluk sitoplazmaları, sitoplazma içinde ve bazen çekirdek içinde çok sayıda vakuol bulunması, hasarlı sitoplazmik membranının olması ve hemen hemen sağlam çekirdeğinin bulunması ile ayırt edilebilir.

b) Geç nekrotik hücreler, sitoplazma kaybı ve hasarlı/düzensiz çekirdek membranı, kısmen sağlam çekirdek yapıları ve sıklıkla çekirdek materyallerinin parçalar halinde çekirdekten çıkması ile ayırt edilebilir.

c) Her iki nekrotik hücrede, çekirdek ve sitoplazma diğer canlı hücrelere göre daha az boyanır (Şekil 3.3. (i)) (156).



Şekil 3.3. a.Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'lü BN hücre; g. NBUD'lu BN hücre; h; Apoptotik hücre; i; Nekrotik Hücre (100X).

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiki analizleri, SPSS 15.0 paket programı (Lisans no: 9869264) ile yapıldı. Çalışmada kullanılacak tavşan sayısı Power Test ile belirlendi (N=10). Gruplar arasındaki fark, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. F değeri önemli bulunduğunda farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulandı. Haftalara göre grupların kendi içindeki fark, eşleşmiş gruplarda t test (Paired t test) ile belirlendi. Veriler ortalama ve ortalamaların standart hatası ($\bar{X}\pm S\bar{x}$) olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. PERFORMANS

4.1.1.Canlı Ağırlık Değişimi

Deneme başında gruplar arasında canlı ağırlık yönünden fark yoktu. Deneme sonunda kontrol grubuna göre; $CrCl_3.6H_2O$ ve pikolinik asit verilen gruplarda canlı ağırlığın önemli düzeyde arttığı ($P<0,05$); CrPic verilen gruptaki artışın ise istatistiki öneme ulaşmadığı saptandı. Canlı ağırlık değişiminde, kontrol grubuna göre $CrCl_3.6H_2O$ ve pikolinik asit verilen gruplarda istatistiki önemde bir artış olmadığı; CrPic verilen grupta ise canlı ağırlığın arttığı ($P<0,05$) belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanların canlı ağırlık (kg) değişimi.

Canlı ağırlık (kg)	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/gün)	CrPic (200µg/gün)	Pikolinik asit (1400 µg/gün)	Önem kontrolü
Deneme başı	10	2,61±0,12	2,80±0,14	2,50±0,04	2,77±0,08	-
Deneme sonu	10	$2,91±0,08^{b}$	$3,23±0,09^{a}$	$3,04±0,05^{ab}$	$3,17±0,08^{a}$	*
Canlı ağırlık değişimi	10	$0,30±0,11^{b}$	$0,43±0,07^{ab}$	$0,54±0,04^{a}$	$0,40±0,04^{ab}$	*

-: Önemsiz (P> 0,05) *: P<0,05

a-b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

4.1.2. Yem Tüketimi

Tavşanların 50 günlük toplam yem tüketimi grup ortalaması olarak belirlendiğinden istatistiki değerlendirme yapılamamakla birlikte, CrPic grubunun kontrol, $CrCl_3.6H_2O$ ve pikolinik asit verilen gruplardan rakamsal olarak daha fazla yem tükettiği belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanların çalışma süresince tükettikleri toplam yem miktarları.

	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/gün)	CrPic (200µg/gün)	Pikolinik asit (1400 µg/gün)
Toplam yem tüketimi (kg)	10	4,77	4,87	5,17	4,52

4.2. KAN PARAMETRELERİ

4.2.1. Oksidatif Stres (Malondialdehit) Parametreleri

4.2.1.1. Serum malondialdehit düzeyleri

Çalışmanın 25. gününde serum MDA düzeyi, CrPic ve pikolinik asit verilen gruplarda kontrol grubuna göre azaldı ($P<0,05$), $CrCl_3.6H_2O$ verilen grup ile kontrol grubu arasında fark saptanmadı. Çalışma sonunda (50. günde) ise serum MDA düzeyleri yönünden kontrol grubu ile deneme grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi (Tablo 4.3, Grafik 4.1).

Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$ verilen grupta MDA düzeyleri 25. güne göre 50. günde önemli ölçüde azaldı ($P<0,01$). Krom pikolinat ve pikolinik asit verilen gruplarda 25. gün ve 50. gün arasında MDA düzeyleri yönünden istatistiki açıdan fark saptanmadı (Tablo 4.3, Grafik 4.1).

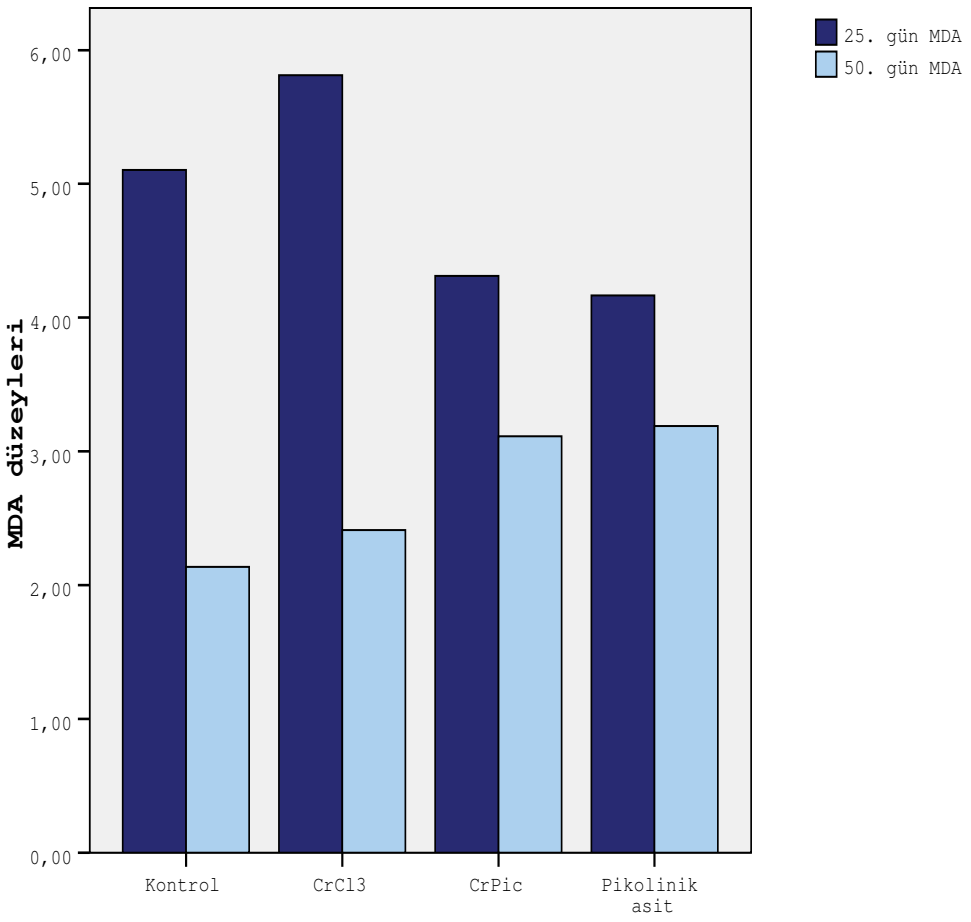
Tablo 4.3. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün serum MDA düzeyleri.

Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
25. gün MDA (µmol/L)	10	$6,22\pm1,01^{aA}$	$5,81\pm0,54^{a\,A}$	$4,31\pm0,42^{b}$	$4,16\pm0,37^{b}$	*
50. gün MDA (µmol/L)	10	$2,13\pm0,19^{B}$	$2,41\pm0,87^{\,B}$	$3,11\pm0,57$	$3,18\pm0,48$	-
Önem kontrolü		**	**	-	-	

-: $P>0,05$ (önemsiz) *: $P<0,05$ **: $P<0,01$

a, b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

A, B: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.



Şekil 4.1. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic, ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün serum MDA düzeyleri.

4.2.1.2. Doku malondialdehit düzeyleri

Çalışma sonunda, tüm gruplarda karaciğer doku örneklerinde MDA düzeyleri istatistiki olarak değişim göstermedi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$**,** CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda doku MDA düzeyleri.

Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
Karaciğer MDA (µmol/L)	6	12,36±1,48	12,98±1,27	11,55±0,87	10,76±0,82	-

-: P >0,05 (önemsiz)

4.2.2. Serum Krom Düzeyleri

Çalışma sonunda, gruplar arasında serum Cr düzeyleri yönünden istatistiki olarak fark saptanmadı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 50. gün serum Cr düzeyleri.

-: P >0,05 (önemsiz)

Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
Serum Cr (ppm)	6	0,0495±0,006	0,0762±0,005	0,0568±0,008	0,0507±0,005	-

4.2.3. Oksidatif DNA Hasarı (8-OHdG) Sonuçları

Çalışmanın 25. gününde alınan kan örneklerinde plazma 8-OHdG değerleri, kontrol grubuna göre $CrCl_3.6H_2O$ ve CrPic verilen gruplarda azalırken (P<0,05), pikolinik asit verilen grupta bir değişme olmadı. Çalışma sonu (50. günde) plazma 8-OHdG değerlerinde, kontrol grubuna göre deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte sayısal bir düşüş olduğu saptandı (P>0,05) (Tablo 4.6, Grafik 4.2). Çalışmanın 25. ve 50. günlerindeki düzeyler arasında, CrPic verilen grupta plazma 8-OHdG düzeyleri yönünden bir fark saptanmazken, kontrol grubu (P<0,01), $CrCl_3.6H_2O$

verilen grup (P<0,05) ve pikolinik asit verilen grupta (P<0,001) 25. güne göre 50. günde önemli düzeyde düşüş belirlendi (Tablo 4.6, Grafik 4.2).

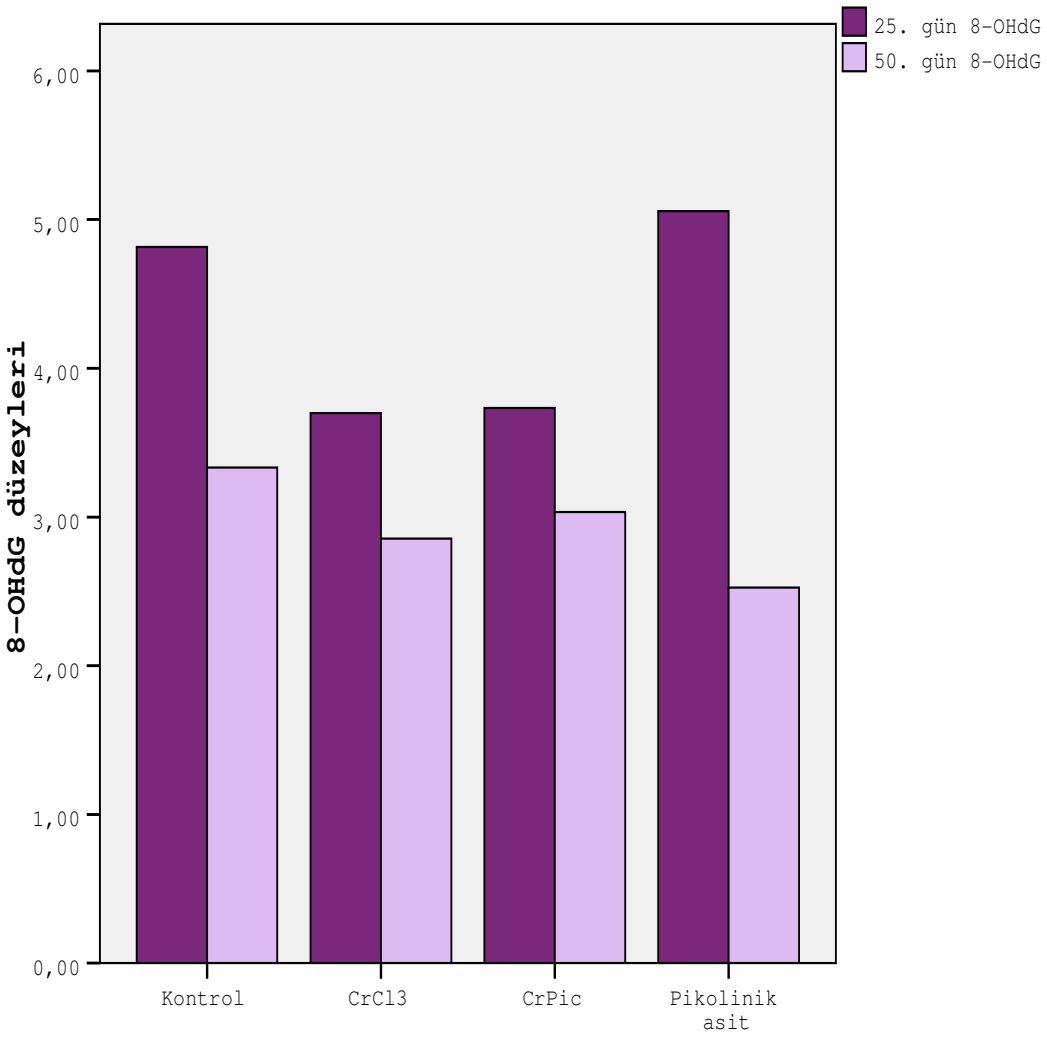
Tablo 4.6. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün 8-OHdG düzeyleri.

Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
25. gün 8-OHdG (ng/mL)	10	$4,82\pm0,40^{aA}$	$3,70\pm0,44^{bA}$	$3,73\pm0,25^{b}$	$5,05\pm0,22^{aA}$	*
50. gün 8-OHdG (ng/mL)	10	$3,33\pm0,32^{B}$	$2,85\pm0,29^{B}$	3,03±0,21	$2,52\pm0,20^{B}$	-
Önem kontrolü		**	*	-	***	

-: P>0,05 (önemsiz) *: P<0,05 **: P<0,01 ***: P<0,001

a, b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

A, B: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.



Şekil 4.2. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen tavşanlarda 25. ve 50. gün 8-OHdG düzeyleri.

4.2.4. DNA Hasar Sonuçları (Mikronükleus, Nükleer Plazmik Köprü ve Nükler Bud Sıklığı)

Kontrol grubu ile deneme gruplarının 25. gün MN, NPK ve NBUD frekansları karşılaştırıldığında, CrPic verilen grupta MN frekansı; pikolinik asit verilen grupta ise MN, NPK, NBUD frekansları azaldı ($P<0,05$), $CrCl_3.6H_2O$ verilen grupta ise herhangi bir değişiklik saptanmadı (Tablo 4.7, Grafik 4.3).

Kontrol ve deneme gruplarının 50. gün MN, NPK, NBUD frekansları karşılaştırıldığında kontrol grubu ile deneme grupları arasında fark olmadığı belirlendi ($P>0,05$, Tablo 4.7, Grafik 4.4).

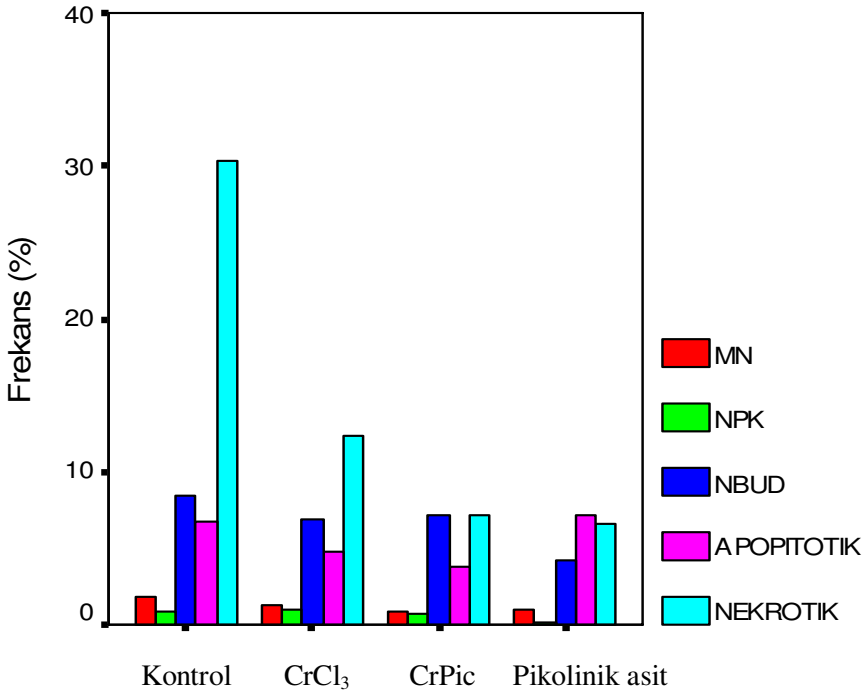
Grupların 25. gün ile 50. gün verileri incelendiğinde, kontrol grubunun MN ($P<0,05$) ve NBUD ($P<0,01$) frekansları; $CrCl_3.6H_2O$ verilen grubun MN ($P<0,05$), NPK ($P<0,01$) ve NBUD ($P<0,01$) frekansları; CrPic verilen grubun da NPK ($P<0,05$) frekansı azaldı. Pikolinik asit verilen grupta ise MN, NPK ve NBUD frekansları yönünden fark saptanmadı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kontrol grubu ile $CrCl_3.H_2O$, CrPic ve pikolinik asit gruplarının kültüre edilmiş periferal lenfositlerinde 25. gün ve 50. gün DNA hasar oranlarının (MN, NPK, NBUD sıklığının) karşılaştırılması.

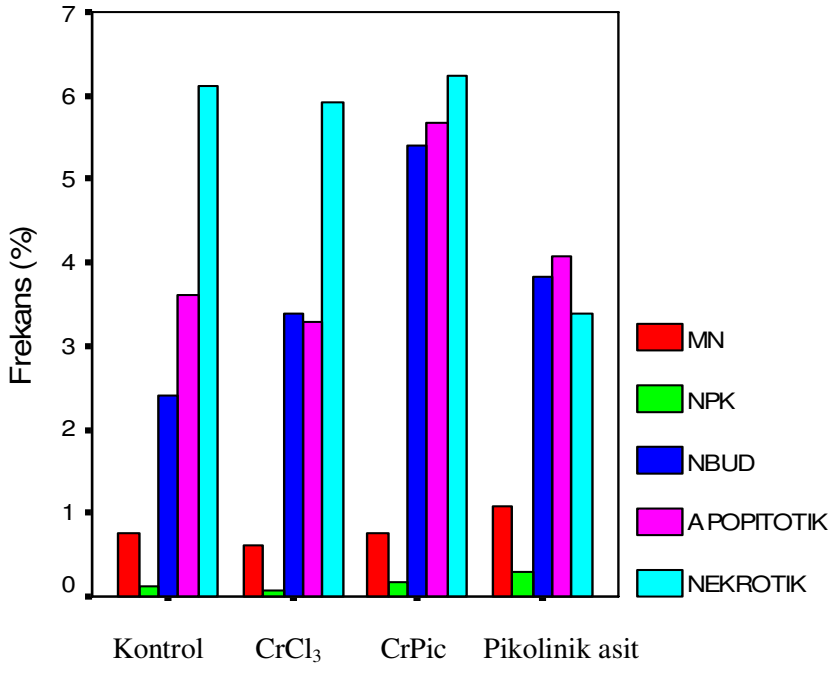
Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
25. gün MN (%)	6	$1,78 \pm 0,34^{aA}$	$1,20 \pm 0,20^{abA}$	$0,83 \pm 0,15^{b}$	$0,92 \pm 0,17^{b}$	*
50. gün MN (%)	6	$0,77 \pm 0,15^{B}$	$0,62 \pm 0,13^{B}$	$0,75 \pm 0,17$	$1,08 \pm 0,11$	-
Önem kontrolü		*	*	-	-	
25. gün NPK (%)	6	$0,90 \pm 0,38^{a}$	$0,98 \pm 0,16^{aA}$	$0,63 \pm 0,38^{abA}$	$0,10 \pm 0,04^{b}$	*
50. gün NPK (%)	6	$0,13 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,05^{B}$	$0,17 \pm 0,02^{B}$	$0,28 \pm 0,07$	-
Önem kontrolü		-	**	*	-	
25. gün NBUD (%)	6	$8,40 \pm 1,06^{aA}$	$7,12 \pm 1,19^{aA}$	$6,85 \pm 0,81^{a}$	$4,17 \pm 0,19^{b}$	*
50. gün NBUD (%)	6	$2,42 \pm 0,28^{B}$	$3,40 \pm 0,28^{B}$	$5,40 \pm 2,57$	$3,83 \pm 0,55$	-
Önem kontrolü		**	**	-	-	

-: P>0,05 (önemsiz) *: P<0,05 **:P<0,01

a, b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.



Şekil 4.3. 25. günde alınan kan örneklerindeki MN, NPK, NBUD, apoptotik, nekrotik hücre frekansları (%).



Şekil 4.4. 50. günde alınan kan örneklerindeki MN, NPK, NBUD, apoptotik, nekrotik hücre frekansları (%).

4.2.5. Sitotoksite Sonuçları (Apoptotik ve Nekrotik Hücre Sıklığı)

Grupların 25. ve 50. gün apoptotik hücre sayıları arasında fark saptanmadı (Tablo 4.8; Grafik 4.5).

Deneme gruplarının 25. gün nekrotik hücre sayıları kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldı ($P<0,001$) (Tablo 4.8; Grafik 4.5).

Nekrotik hücre sayısının 50. günde kontrol grubuna göre pikolinik asit verilen grupta daha düşük olduğu ($P<0,01$), $CrCl_3.6H_2O$ ve CrPic verilen gruplarda ise istatistiki olarak değişmediği saptandı (Tablo 4.8; Grafik 4.5)

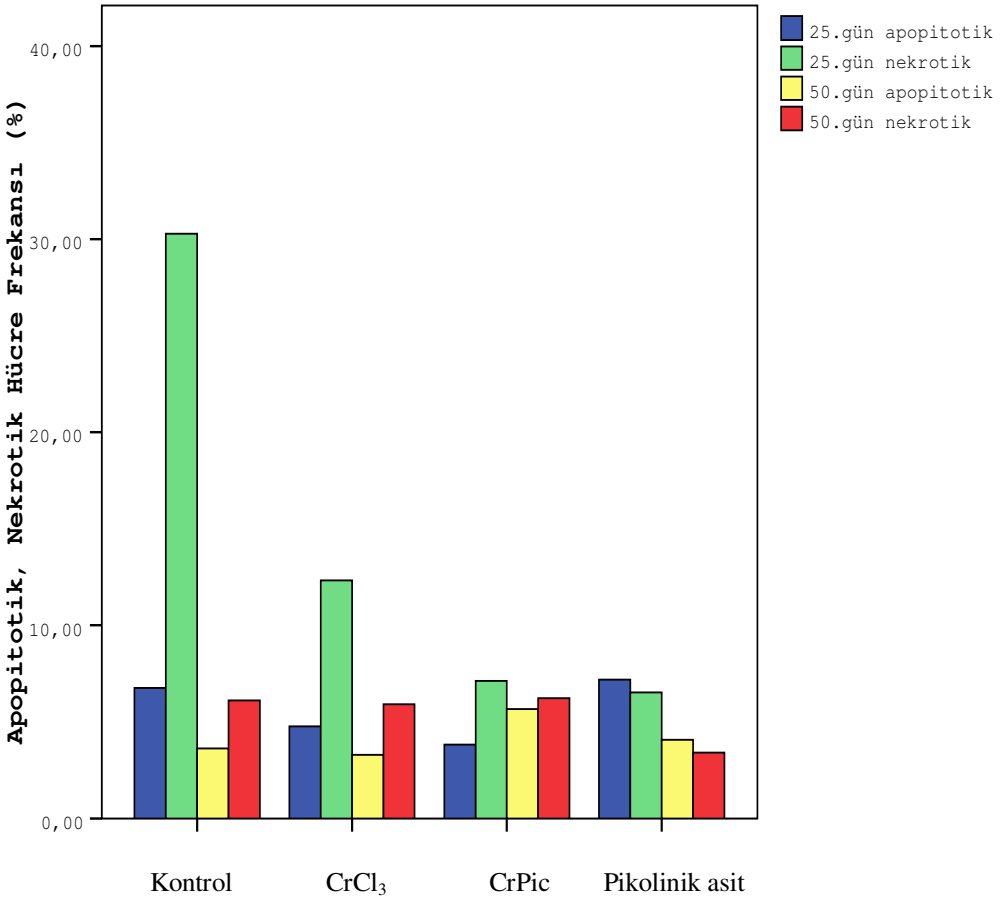
Denemenin 25. gününe göre 50. gününde kontrol grubunda apoptotik ($P<0,05$) ve nekrotik hücre ($P<0,01$) oranları; $CrCl_3.6H_2O$ ($P<0,05$) ve pikolinik asit ($P<0,01$) verilen gruplarda da nekrotik hücre oranları azaldı. Krom pikolinat verilen grupta ise 25. ve 50. günler arasında hücre ölüm oranları yönünden önem saptanmadı (Tablo 4.8; Grafik 4.5).

Tablo 4.8. Kontrol grubu ile $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit gruplarının 25. ve 50. günde alınan kan örneklerinin kültüre edilmiş periferal lenfositlerindeki hücre ölüm oranlarının karşılaştırılması.

Parametre	N	Kontrol	$CrCl_3.6H_2O$ (20 mg/kg)	CrPic (200 µg)	Pikolinik asit (1400 µg)	Önem kontrolü
25. gün Apoptotik hücre (%)	6	$6,75 \pm 0,81^{A}$	$4,77 \pm 1,30$	$3,82 \pm 0,37$	$8,35 \pm 2,21$	-
50. gün Apoptotik hücre (%)	6	$3,62 \pm 0,38^{B}$	$3,30 \pm 0,41$	$5,67 \pm 2,01$	$4,07 \pm 0,76$	-
Önem kontrolü		*	-	-	-	
25. gün Nekrotik hücre (%)	6	$30,28 \pm 4,05^{aA}$	$12,33 \pm 2,04^{bA}$	$7,12 \pm 1,56^{b}$	$6,53 \pm 0,89^{bA}$	***
50. gün Nekrotik hücre (%)	6	$6,12 \pm 0,66^{aB}$	$5,92 \pm 0,45^{aB}$	$6,23 \pm 0,38^{a}$	$3,40 \pm 0,48^{bB}$	**
Önem kontrolü		**	*	-	**	

-: P>0,05 (önemsiz) *P<0,05 **P <0,01 ***P<0,001

a, b: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.



Şekil 4.5. 25. ve 50. gün alınan kan örneklerindeki apoptotik ve nekrotik hücre frekansları (%).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan ve hayvan organizmasında önemli bir yere sahip olan mineral maddeler, canlıların yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmede önemli görevler üstlenirler. Bunlar; membran geçirgenliği, metabolizma, hormon ve enzim fonksiyonları, büyüme ve üretim faaliyetleri gibi görevlerdir. Organizmaya tamamen beslenme ile alınan Cr'un karbonhidrat, protein, lipid metabolizmalarını etkilediği (2, 47, 48), çeşitli hayvan türlerinde performans (18, 68, 81, 93, 94) ile karkas özelliklerini (17, 95) olumlu etkilediği gösterilmiştir. Broylerlerde (80) ve yumurtacı bıldırcınlarda (97, 62) $CrCl_3.6H_2O$'den sağlanan 20 mg/kg Cr ile yapılan çalışmalarda canlı ağırlığın etkilenmediği bildirilmiştir. Öte yandan broylerlerde yeme CrPic (96) ve $CrCl_3.6H_2O$ (88) formlarında; hindi palazlarında krom nikotinat formunda ilave edilen Cr'un (87) canlı ağırlığı artırdığı ifade edilmiştir. Sunulan çalışmada da deneme sonunda kontrol grubuna göre tüm deneme gruplarında canlı ağırlığın arttığı gözlenmiş ancak, yem tüketimin en fazla olduğu CrPic verilen gruptaki canlı ağırlık artışının önemli olması ($P<0,05$) CrPic'ın yem tüketimini arttırdığını gösterebilir. Ayrıca, inorganik krom bileşiklerine göre organik krom bileşiklerinin daha iyi emilmesi (48, 49) canlı ağırlık artışında etkili olmuş olabilir.

Son zamanlarda, CrPic'ın pek çok ülkede insanlar tarafından, besin maddelerinden sağlanan krom'a ek olarak, sakız, spor içecekleri, beslenme çubukları ve ilaç gibi çeşitli formlarda yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (44). Ancak, bu sentetik krom bileşiğinin yararlı etkilerinin olduğunu bildiren (17, 18, 68, 81, 93-95) pek çok

çalışmanın aksine, sitotoksik ya da genotoksik etkilerinin olduğunu ileri süren birçok çalışmanın (25-27, 31) da olması nedeniyle sentetik olarak üretilen bu krom bileşiğinin güvenli olarak kullanılıp kullanılmayacağı konusu tartışılır hale gelmiştir (38, 39, 42, 44, 92).

Fizyolojik konsantrasyonlardaki CrPic'ın askorbik asit ve thiol gibi biyolojik redüktanlarla Cr^{+2} bileşiklerine indirgendiği, havayla oksidasyona duyarlı oldukları için bu bileşiklerin DNA harabiyetine yol açan hidroksil radikallerini ($HO^{\cdot}$) oluşturduğu ileri sürülmektedir (39). Yüksek düzeylerde CrPic'ın $HO^{\cdot}$ oluşumunu ve hücre hasarını artırdığı bildirilmiştir (25, 37, 38). Krom pikolinat'ın fizyolojik konsantrasyonlarının (50-260 ppb) dahi ROT oluşumuna yol açtığı (42) ileri sürülmektedir. Öte yandan $CrCl_3$'ün lipid peroksidasyonunu baskılayarak ROT oluşumunu engellediği bildirilmiştir (54).

Lipid peroksidasyon ürünleri içinde en çok sentezlenen (114) ve perokside olmuş lipidlerde oluşan ve oksidatif stres şartlarında kan ve idrarda saptanabilir düzeye ulaştığı bildirilen MDA (118-120) düzeyinin krom ile azaltılabileceği (97, 166) gösterilmiştir. Anderson et al. (78), tip 2 diyabetiklerde, plazma glikozunun yüksek düzeyde olması veya küçük moleküllerin otooksidasyona uğraması sonucu plazma TBARS düzeyinin önemli oranda yükseldiğini belirtmişler, krom pidolatın (400 µg/gün) artan TBARS düzeyini %18,2 azalttığını saptamışlardır. Hamsterlerde krom ve üzüm çekirdeği ekstresinin kombine verilmesiyle, TBARS düzeyinin %77 oranında azaldığı bildirilmiştir (166). Sunulan çalışmada da 25. gün ölçümlerinde MDA düzeyinin, CrPic ve pikolinik asit verilen gruplarda azalma göstermesi ($P<0,05$), sıcaklık stresine maruz bırakılan yumurtacı bıldırcınlarda artan serum MDA düzeyinin yeme Cr ilavesiyle düştüğünü bildiren Gültekin (97)'in bulgularını desteklemektedir. Preuss et al. (51) ratlar üzerinde yürüttükleri çalışmalarında, rasyona ilave edilen 5 mg/kg krom asetat ve krom nikotinatın TBARS düzeyini azaltmasına karşın, CrPic'ın etkisinin az olduğunu, $CrCl_3$'ün ise hepatik ve renal TBARS düzeyini etkilemediğini ileri sürmüşlerdir. Preuss et al. (51) bildirimlerinin aksine, sunulan çalışmanın 25. gününde kontrol grubuna göre CrPic ve pikolinik asit verilen gruplarda serum MDA düzeyinin düştüğü ($P<0,05$), karaciğer MDA düzeyinde istatistiki olarak önemli olmamakla birlikte hafif bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Ancak, çalışmada $CrCl_3.6H_2O$'ün serum MDA düzeyinde anlamlı olmayan bir düşüşe neden olması ve karaciğer MDA düzeyi üzerine ise etkisinin olmaması, Preuss et al. (51), bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Krom'un

karaciğer MDA düzeyini etkilememesi, genel olarak bu elementin hücre içerisinde kalma süresinin kısa olması, dolayısıyla karaciğerdeki birikiminin az olmasından ileri gelebilir ve ayrıca, CrPic formunun da hepatosit mikrozomlarında modifiye edilerek komponentlerine ayrışmasından (52, 54) kaynaklanabilir. Diğer yandan, CrPic ve $CrCl_3.6H_2O$'ün serum krom düzeyini etkilememesi, kromun organizmadan hızla atılmasına (1, 61) bağlı olarak kan dolaşımında daha kısa süreli kalmasına bağlı olabilir. Buzağı timusunda yapılan bir çalışmada $CrCl_3$ gibi iz metallerin 8-OHdG uyarımını etkilemediği belirlenmiştir (168). Chang et al. (169) ise Yeni Zelanda tavşanlarında serbest oksijen radikal düzeyindeki azalmaya paralel olarak karaciğerde 8-OHdG düzeyinin düştüğünü belirlemişlerdir. Sunulan çalışmanın 25.gününde, CrPic ($P<0,05$) ile istatistiki açıdan önemli olmasa da $CrCl_3.6H_2O$ verilen hayvanların serum MDA düzeylerindeki azalma ile plazma 8-OHdG ($P<0,05$) düzeylerinde saptanan düşüş uyum içindedir. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, organizmada ROT'nin guaninin 8. C atomuna OH grubu ekleme sonucu ortaya çıkmaktadır (133, 134, 136). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, ROT'ne bağlı olarak gelişen DNA hasarının önemli bir belirteci olduğundan (129, 135, 137), bu çalışmada CrPic'ın, DNA üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını, aksine ROT'ne bağlı DNA hasarının önlenmesinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Krom bileşiklerinin toksik etkilerinin incelendiği *in vitro* çalışmalar ile hayvanlar üzerinde yürütülen bazı çalışmalarda, bazı Cr^{+3} komplekslerinin genotoksik ve sitotoksik etkiler oluşturduğu (25, 26, 42), bazılarının ise oluşturmadığı bildirilmiştir (32, 34, 35).

Nükleusun şekil ve fragmentasyon yapısındaki morfolojik değişiklikler hücresel hasarın en önemli göstergesidir. Hücresel hasarda morfolojik değişiklikler, kromatin kondenzasyonu, apoptotik hücrelerdeki oluşum, aneuploid DNA ve DNA fragmentasyonunu içerir. Gebe ratlara 200 mg/kg CrPic, 200 mg/kg $CrCl_3$ ve 174 mg/kg pikolinik asit verilerek yapılan çalışmada (39), yüksek seviyede verilen Cr takviyesinin gebelik diyabeti gibi yavru üzerinde istenmeyen sonuçlara neden olabilecek durumlara yol açtığı belirtilmiştir. Stearns et al. (25), Chinese hamster ovaryumlarında yapmış oldukları ve çözünür formdaki CrPic'ın 0,025; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 mM dozlarının; partiküler formda 4,0; 8,0; 40 µg/cm2 dozlarının ve pikolinik asit formunda ise 1,0; 1,5; 2,0 mM dozlarını kullandıkları çalışmalarında, CrPic'ın hem çözünür hem de partiküler formunun klastojenik olduğunu ve bu klastojen etkinin, çözünür CrPic için 50 µM ile

1,0 mM ve partiküler form için 40 µg/cm^2'nin üzerindeki dozlara bağlı olarak geliştiğini, toksisiteye bağlı olarak hücre döngüsünün ertelendiğini ve metafazın azaldığını ortaya koymuşlardır.

Komorowski et al. (40), Sprague-Dawley ratlarda CrPic'ın kemik iliği üzerine sitogenetik etkilerini araştırmışlar, ratlara 33, 250 ya da 2000 mg/kg düzeylerinde oral yolla verilen CrPic'ın erkek ya da dişi ratlarda kromozomal anormalilere yol açmadığını göstermişlerdir. Ratlara (2500 mg/kg) ve farelere (50000 mg/kg) oral olarak verilen yüksek düzeydeki CrPic'ın da *in vivo* şartlarda kromozomal bir hasara yol açmadığı; *in vivo* ortamda mikronükleus oluşturmadığı belirtilmiştir (171). Whittaker et al. (36), *Salmonella typhimurium* ve L5178Y fare hücre hatlarında CrPic ve bileşenlerinin etkilerini belirlemek için CrPic, $CrCl_3$ ve pikolinik asidin lenfosit mutasyonu, hücresel toksisite ve mutajenitesini değerlendirmişler, hem CrPic hem de $CrCl_3$'ün bakterilerde mutajenik etkiye yol açmadığını, ancak L5178Y farelerde nispeten toksik olmayan dozların dahi mutajenik hasara yol açtığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, İmamoğlu ve ark. (31) da günlük 400 µg CrPic'ın buzağıların lenfositlerindeki MN sıklığını artırdığını, fakat 200 µg CrPic verilenlerde ise bu etkinin görülmediğini belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada ise denemenin 25. gününde kontrol grubuyla kıyaslandığında, deneme gruplarının hepsinde MN sıklığı yönünden düşüşler olduğu; CrPic ile pikolinik asit verilen hayvanlarda görülen düşüşün daha da belirgin ($P<0,05$) olduğu gözlendi. NPK sıklığı yönünden ise CrPic ve pikolinik asidin NPK sıklığını azalttığı, pikolinik asitteki azalmanın daha belirgin ($P<0,05$) olduğu saptandı. NBUD sıklığı da $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit verilen gruplarda azalma eğilimi göstermiş olup, sadece pikolinik asit verilen gruptaki azalma önemli ($P<0,05$) bulundu.

Manygoats et al. (26) CrPic'ın CHO AA8 hücrelerinde morfolojik değişiklik oluşturduğunu CrPic seviyesindeki artışa paralel olarak apoptozun arttığını bildirmişlerdir. Buzağılarda da CrPic miktarının artışı ile fragmente ve düzensiz şekilli nükleus oranında artış olduğu, apoptotik hücrelerde de doza bağlı bir artış olduğu bildirilmiştir (31). Shirivastava et al. (28), insanların dermal fibrokistleri üzerinde yürüttükleri çalışmada 1, 10, 50 ve 100 µM düzeylerinde CrPic, $CrCl_3$, $[Cr(salen)(H2O)2]^+$, $[Cr(edta)(H2O)]^-$, $[Cr(en)3]^{3+,}$ $[Cr(ox)3]^{3-}$gibi üç değerlikli Cr komplekslerinin nükleer düzeyde sitotoksik olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise kontrol ve deneme grupları arasında apoptotik hücre sayısı yönünden fark saptanmazken, 25. günde alınan kan örneklerinde $CrCl_3.6H_2O$, CrPic ve pikolinik asit

verilen gruplarda nekrotik hücre sayısının kontrol grubuna göre önemli ($P<0,001$) ölçüde azaldığı belirlendi. Çalışmanın 25. gününde kontrol grubuyla kıyaslandığında, deneme gruplarının tümünde nekrotik hücre sayısında görülen düşüşler önemli ($P<0,001$) bulunurken, denemenin 50. gününde sadece pikolinik asit verilen gruptaki azalma önemli ($P<0,01$) bulundu. Bu çalışmada gerek $CrCl_3.6H_2O$'ün gerekse CrPic'ın apoptotik hücre sayılarını etkilememesi ve nekrotik hücre sayılarında azalma sağlaması daha önce yapılmış olan bazı çalışmaların (40, 171) bulguları ile paralellik gösterirken, bazı çalışmaların (25, 31, 36, 39) sonuçlarıyla örtüşmemektedir. Bu çalışmanın sonuçları ile literatür bildirimleri arasındaki farklılık, sunulan çalışmada kullanılan krom bileşiklerinin düzeylerinin daha düşük olmasından kaynaklanabilir. Söz konusu literatürlerin çoğunda CrPic'ın yüksek düzeylerinin sitotoksik veya genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, tavşanlara gavaj yoluyla günde 20 mg/kg $CrCl_3.6H_2O$, 200 µg CrPic ve 1400 µg pikolinik asitin kısa süreli uygulamalarının sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olmadığını aksine, oksidatif ve kromozomal DNA hasarının önlenmesinde CrPic'ın olumlu rol oynayabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Mertz W. Chromium occurrence and function in biological systems. Physicologycal Reviews. Walter Read Army Medical Center, Washington, 1969; 163-239.
2. McDowell LR. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press 1992: p 265-293.
3. Vincent JB. Of chromium action: low-molecular-weight chromium binding substance. J Am Coll Nutr 1999; 18: 6-12.
4. Striffler JS, Law JS, Polansky MM, et al. Chromium improves insulin response to glucose in rats. Metabolism 1995; 44: 1314-1320.
5. Riales R and Albrink MJ. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men. Am J Clin Nutr 1981; 34: 2670-2678.
6. Mossop RT. Effects of chromium (III) on fasting blood glucose, cholesterol and cholesterol HDL levels in diabetic. Central African J Med 1983; 29: 80-82.
7. Ducros V. Chromium metabolism. A literature review. Biol Trace Elem Res 1992; 32: 65-77.
8. DiSylvestro RA, Dy E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. J Trace Elem Med Biol 2007; 21: 120-124.

9. Lukaski HC, Siders WA, Penland JG. Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight, composition, and iron status. Nutr 2007; 23: 187-195.

10. National Research Council (N.R.C.). The Role of Chromium in Animal Nutrition. National Academic Pres, Washington DC, 1997: p 202-310.

11. Sell JL. The role of chromium in animal nutrition. National Academy Press Washington, DC, 1997: 162-169.

12. Clarkson PM. Effects of exercise on chromium levels. Is supplementation required? Sports Med 1997; 23: 341-349.

13. İnanç N, Uyanık F, Şahin H, et al. Effects of chromium supplementation on body composition, leptin, ghrelin levels and selected biochemical parameters in obese women. Trace Elem Electrol 2006; 23: 128-133.

14. Moonsie-Shageer S, Mowat DN. Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. J Anim Sci 1993; 71: 232-238.

15. Lindemann MD, Wood CM, Harper AF, Kornagay ET, Anderson RA. Dietary chromium picolinate additions improve gain: feed and carcass characteristics in growing finishing pigs and increase litter size in reproducing sows. J Anim Sci 1995; 73: 457-465.

16. Mooney KW, Cromwell GL. Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential carcass modifiers in swine. J Anim Sci 1997; 75: 2661-2671.

17. Uyanık F. The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. Biol Trace Elem Res 2001; 84: 93-101.

18. Uyanık F, Atasever A, Özdamar S, et al. Effects of dietary chromium chloride supplementation on performance, some serum parameters and immune response in broilers. Biol Trace Elem Res 2002; 90: 99-115.

19. Uyanık F, Kocaoğlu Güçlü B, Can Şahna K, et al. Effects of chromium picolinate on weight gain, selected blood metabolites, leptin and immunity in calves. J Anim Vet Adv 2008; 7: 564-569.

20. Evans GW. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. Inter J Bios Med Res 1989; 11: 163-180.

21. Crawford V, Scheckenbach R, Preuss HG. Effects of niacin-bound chromium supplementation on body composition in overweight African-American women. Diabetes Obes Metab 1999; 1: 331-337.

22. Hellerstein MK. Is chromium supplementation effective in managing type II diabetes? Nutr Rev 1998; 56: 302-306.

23. Lukaski HC. Chromium as a supplement. An Rev Nutr 1999; 19: 279-302.

24. Vincent JB. The bioinorganic chemistry of chromium (III). Polyhedron 2001; 20: 1–26.

25. Stearns DM, Wise Sr JP, Patierno SR, et al. Chromium (III) picolinate produce chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. FASEB J 1995; 9: 1643-1648.

26. Manygoats KR, Yazzie M, Stearns DM. Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. J Biol Inorg Chem 2002; 7: 791-798.

27. Hepburn DD, Xiao J, Bimdom S, et al. Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 3766-3771.

28. Shirivastava HY, Ravikumar T, Shanmugasundaram N, et al. Cytotoxicity studies of chromium (III) complexes on human dermal fibroblast. Free Radic Biol Med 2005; 38: 58-69.

29. Stallings DM, Hepburn DD, Hannah M, et al. Nutritional supplement chromium picolinate generates chromosomal aberrations and impedes progeny development in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res 2006; 610: 101-113.

30. Coryell VH, Stearns DM. Molecular analysis of hprt mutations induced by chromium picolinate in CHO AA8 cells. Mutat Res 2006; 610: 114-123.

31. İmamoğlu N, Uyanık F, Güçlü BK, et al. Effects of chromium picolinate in micronucleus frequency and morphology of lymphocytes in calves. Biol Trace Elem Res 2008; 125: 133-140.

32. Anderson RA. Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium. J Am Coll Nutr 1997; 16: 404-410.

33. Kato I, Vogelman JH, Dilman V, et al. Effect of supplementation with chromium picolinate on antibody titers to 5-hydroxymethyl uracil. Euro J Epidem 1998; 14: 621-626.

34. Rhodes MC, Hebert CD, Herbert RA, et al. Absence of toxic effects in F344/N rats and B6C3F1 mice following subchronic adminitration of chromium picolinate monohydrate. Food Chem Toxicol 2005; 43: 21-29.

35. Slesinski RS, Clarke JJ, San RH, et al. Lack of mutagenicity of chromium picolinate in the hyphoxanthine phosphoribosyltransferase gene mutation assay in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res 2005; 585: 86-95.

36. Whittaker P, San RH, Clarke JJ, et al. Mutagenicity of chromium picolinate and its components in Salmonella typhimurium and L5178Y mouse Iymphoma cells. Food Chem Toxicol 2005; 43: 1619-1625.

37. Speetjens JK, Collins RA, Vincent JB, et al. The nutritional supplement chromium (III) tris (picolinate) cleaves DNA. Chem Res Toxicol 1999; 12: 483-487.

38. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. Toxicol 2003; 180: 175-177.

39. Bailey MM, Boohaker JG, Sawyer RD, et al. Exposure of pregnant mice to chromium picolinate results in skeletal defects in their offspring. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2006; 77: 244-249.

40. Komorowski JR, Greenberg D, Juturu V. Chromium picolinate does not produce chromosome damage. Toxicol in Vitro 2008; 22: 819-826.

41. Mozaffari MS, Baban B, Abdelsayed R, et al. Renal and glycemic effects of high-dose chromium picolinate in db/db mice: assessment of DNA damage. J Nutr Biochem 2012; 23: 977–985.

42. Hepburn DD, Vincent JB. Tissue and subcellular distribution of chromium picolinate with time after entering the bloodstream. J Inorg Biochem 2003; 94: 86-93.

43. Barceloux DG. Chromium. Clin Toxicol 1999; 37: 173-194.

44. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K. Opinion controversy to chromium picolinate therapy's safety and efficacy: ignoring 'anecdotes' of case reports or recognising individual risks and new guidelines urgency to introduce innovation by predictive diagnostics? The EPMA J 2012; 3-11.

45. Prasad AS. Chromium. Trace Elements and Iron in Human Metabolism. John Wiley and Sons LTD. New York. 1978: 3-12.

46. Offenbacher EG, Pi-Sunyer FX. Chromium in human nutrition. Ann Rev Nutr 1988; 8: 543-563.

47. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar M, Tiftik AM. Biyokimya. Nobel Yayın Dağıtım. Ankara. 2000: 51-52.

48. Anonim. Chromium. World Health Organisation. Genova, 1996; 155-159.

49. Stout MD, Nyska A, Collins BJ, et al. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of chromium picolinate monohydrate administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice for 2 years. Food Chem Toxic 2009; 47: 729–733.

50. Chen SY, Lien TF. Toxicity evaluation of chromium picolinate nanoparticles *in vivo* and *in vitro* in rat. Biol Trace Elem Res 2013; 151: 247–255.

51. Preuss HG, Grojec PL, Lieberman S, et al. Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneusly hypertensive rats. Clin Nephrol 1997; 47: 325-330.

52. Vincent JB. The biochemistry of chromium. J Nutr 2000; 130: 715-718.

53. Scientific Opinion on the safety of chromium picolinate as a source of chromium added for nutritional purposes to foodstuff for particular nutritional uses and to foods intended for the general population1 EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) 2, 3 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2010; 8: 1883.

54. Vincent JB. The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. Sports Med 2003; 33: 213-230.

55. Yamamoto A, Wada O, Ono T. Distribution and chromium-binding capacity of a low-molecular-weight, chromium-binding substance in mice. J Inorg Biochem 1984; 22: 91-102.

56. Borguet F, Cornelis R, Delanghe J, et al. Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Chim Acta 1995; 238: 71-84.

57. Büyükleblebici O, Karagül H. Streptozotosin ile deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda kromun biyokimyasal etkileri. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2012; 18: 21-26.

58. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, et al. Urinary chromium excretion of human subjects: effects of chromium supplementation and glucose loading. Am J Clin Nutr 1982; 36: 1184-1193.

59. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, et al. Supplemental-chromium effects on glucose, insulin, glucagon and urinary chromium losses in subjects consuming controlled low-chromium diets. Am J Clin Nutr 1991; 54: 909-916.

60. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Chromium. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin C, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, DC, National Academy Press, 2002: p 197–223.

61. Anderson RA, Polansky MM. Dietary and metabolite effects on trivalent chromium retention and distribution in rats. Biol Trace Elem Res 1995; 50: 97-108.

62. Uyanık F, Eren M, Kocaoğlu Güçlü B, et al. Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of Japanese quails. Biol Trace Elem Res 2005; 103: 187-197.

63. Ding W, Chai Z, Duan P, Feng W, Qian Q. Serum and urine chromium concentrations in elderly diabetics. Biol Trace Elem Res 1998; 63: 231-237.

64. Steele NC, Rosebrough RW. Trivalent chromium and nicotinic acid supplementation for turkey poult. Poultry Sci 1979; 58: 983-984.

65. Bahijiri SM, Mira SA, Mufti AM, et al. The effects of organic chromium and brewer's yeast supplementation on glucose tolerance, serum lipids and drug dosage in individuals with type 2 diabetes. Saudi Med J 2000; 21: 831-837.

66. Wang S, Sun C, Kao Q, et al. Effects of chromium and fish oil on insulin resistance and leptin resistance in obese developing rats. Wei Sheng Yan Jiu 2001; 30: 284-286.

67. Clodfelder BJ, Gullick BM, Lukaski HC, et al. Oral administration of the biomimetic [Cr(3)O(O(2)CCH(2)CH(3))(6)(H(2)O)(3)]+ increases insulin sensitivity and improves blood plasma variables in healty and type 2 diabetic rats. J Biol Inorg Chem 2005; 10: 316.

68. Króliczewska B, Zawadzki W, Dobrzanski Z, et al. Changes in selected serum parameters of broiler chicken fed supplemental chromium. J Anim Physiol Anim Nutr 2004; 88: 393-400.

69. Nelson DL, Cox MM. Lehningers Principles of Biochemistry (4^{th} ed). Worth Publishers, New York, 2000: 881-890.

70. Sun C, Zhang W, Wang S, et al. Effect of chromium gluconate on body weight, serum leptin and insülin in rats. Wei Sheng Yan Jiu 2000; 29: 370-371.

71. Wang SR, Ma WW, Niu YC, et al. Effects of chromium and fish oil on the level of leptin and insulin in obese rats. Wei Sheng Yan Jiu 2006; 35: 43-45.

72. Chen G, Liu P, Pattar GR, et al. Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. Mol Endocrinol 2006; 20: 857-870.

73. Lucidi RS. Effect of chromium supplementation on insulin resistance and ovarian and menstrual cyclicity in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2005; 84: 1755-1757.

74. Abraham AS, Brooks BA, Eylath U. The effects of chromium supplementation on serum glucose and lipids in patients with and without non-insulin-dependent. Metabolism 1992; 4: 768-771.

75. Lefavi RG, Wilson GD, Keit RE, et al. Lipid-lowering effect of a dietary chromium (III)-nicotinic acid complex in male athletes. Nutr Res 1993; 13: 239-249.

76. Trow LG, Lewis J, Greenwood RH, et al. Lack of effect of dietary chromium supplementation on glucose tolerance, plasma insulin and lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. Int J Vitam Nutr Res 2000; 70: 14-18.

77. Amato P, Morales AJ, Yen SSC. Effects of chromium picolinate supplementation on insulin sensitivity, serum lipids, and body composition in healthy, nonobese, older men and women. J Gerant Series a Biol Sci Med Sci 2000; 55: 260-263.

78. Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, et al. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. Am Coll Nutr 2001; 20: 212-218.

79. Page TG, Southern LL, Ward TL, et al. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. J Anim Sci 1993; 71: 656-662.

80. Cupo MA, Donaldson WE. Chromium and vanadium effects on glucose metabolism and lipid synthesis in the chick. Poultry Sci 1987; 66: 120-126.

81. Bryan MA, Socha MT, Tomlinson DJ. Supplementing intensively grazed late-gestation and early-lactation dairy cattle with chromium. J Dairy Sci 2004; 87: 4269-4277.

82. Matthews JO, Southern LL, Fernandez JM, et al. Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows. J Anim Sci 2001; 79: 2172-2178.

83. Hayırlı A, Bremmer DR, Bertics SJ, et al. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 2001; 84: 1218-1230.

84. Lien T, Chen S, Shiau S, et al. Chromium picolinate reduces laying hen serum and egg yolk cholesterol. Profess Anim Sci 1996; 12: 77-80.

85. Yıldız AÖ, Parlat SS, Yazgan O. The effects of organic chromium supplementation on production traits and some serum parameters of laying quails. Revue Med Vet 2004; 155: 642-646.

86. Kalaycıoğlu L, Coşkun B, Kurtoğlu F, et al. Effects of chromium and magnesium supplementation in broiler diets on body weight and some blood parameters. Indian J Anim Sci 1999; 69: 832-837.

87. Chen KL, Lu JJ, Lien TF, et al. Effects of chromium nicotinate on performance, carcase characteristics and blood chemistry of growing turkeys. Br Poult Sci 2001; 42: 399-404.

88. Eren M, Başpınar N. Effects of dietary $CrCl_3$ supplementation on some serum biochemical markers in broilers. Influence of season, age and sex. Revue de Med Vet 2004; 155: 637-641.

89. Kolsuz SŞ, Uyanık F. Yumurta tavuklarında yeme krom ilavesinin serum kalsiyum, fosfor, magnezyum ve çinko düzeylerine etkisi. Erciyes Üniv Sağlık Bilim Derg 2002; 11: 67-75.

90. Mowat DN, Chang X. Yang WZ. Chelated chromium for stressed feeder calves. Can J Anim Sci 73; 1: 49-55.

91. Campbell WW, Beard JL, Joseph LJ, et al. Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: effects on iron-status and hematologic indexes. Am J Clin Nutr 1997; 66: 944-949.

92. Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM. Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. J Am Coll Nutr 1997; 16: 273-279.

93. Uyanık F, Kaya Ş, Kolsuz AH et al. The effect of chromium supplementation on egg production, egg quality and some serum parameters in laying hens. Turk J Vet Anim Sci 2002; 26: 379-387.

94. Smith KL, Waldron MR, Drackley JK, et al. Performance of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the transition period. J Dairy Sci 2005; 88: 255-263.

95. Lien TF, Wu CP, Wang BJ, et al. Effect of supplemental levels of chromium picolinate on the growth performance, serum traits, carcass characteristics and lipid metabolism of growing-finishing pigs. Anim Sci 2001; 72: 289-296.

96. Lien TF, Horng YM, Yang KH. Performance, serum charactesictics, carcase traits and lipid metabolism of broilers as affected by supplement of chromium picolinate. Br Poult Sci 1999; 40: 357-363.

97. Gültekin, M. Yumurtacı Bıldırcınlarda Oluşturulan Isı Stresinde Krom ve Çinkonun Bazı Kan Parametrelerine Etkileri, Yüksek lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2007: 56.

98. Anderson RA. Recent advances in the clinical and biochemical effects of chromium deficiency. Prog Clin Biol Res 1993; 380: 221-234.

99. Striffler JS, Law JS, Polansky MM, Bhathena SJ, Anderson RA. Chromium improves insulin response to glucose in rats. Metabolism 1995; 44: 1314-1320.

100. Frank A, Anke M, Danielsson R. Experimental copper and chromium deficiency and additional molybdenum supplementation in goats. I. Feed consumption and weight development. Sci Total Environ 2000; 249: 133-142.

101. Cotton FA, Willinson G. The Chemistry of transition elements. In: Chromium. Group VI B (6), Advanced Inorganic Chemistry. 5th ed. NY, USA, John Wiley & Sons, 1988: p 679–697.

102. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1990) Chromium, nickel and welding. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 49. IARC, Lyon, pp 49-256.

103. Aydın A, Sayal A, Işımer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gata Basımevi, Ankara, 2001: 2-60.

104. Çevik A. Broilerlerde Bakır Noksanlığına Bağlı Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Yanıt, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2004: 71.

105. Kargın F, Fidancı UR. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar. Türk Vet Hek Derg 1997; 9: 26-28.

106. Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde comet assay. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30: 1365-73.

107. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Derg 2006; 31: 51-56.

108. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 159-169.

109. Abou El-Soud SB, Ebeid TA, Eid YZ. Physiological and antioxidative effects of dietary acetylsalicylic acid in laying japanese quail under high temperature. J Poultry Sci 2006; 43; 255-265.

110. Bollengier-Lee S, Mitchell MA, Utomo DB, et al. Influence of high dietary vitamin E supplementation on egg production and plasma characteristics in hens subjected to heat stress. Br Poult Sci 1998; 39: 106-112.

111. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine EIA kit prospectus book. Nortwest Life Science Specialtist and LLC Catalog. NWK 8-OHdG 02; p 1-10.

112. Venditti P, Daniele C M, Balestrieri M, et al. Protection against oxidative stres in liver of four different vertebrates. J Exp Zool 1999; 284: 610-616.

113. Marnett LJ. Lipid peroxidations-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res 1999; 424: 83-95.

114. Feng Z, Hu W, Marnett LJ, et al. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV and BPDE induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. Mutat Res 2006; 601: 125-136.

115. Tiyobarbütirik asit EIA kit prospectus book. Cayman Chemical Company. Catalog no. 10009055; p 1-13.

116. Chancerelle Y, Mathieu J, Kergonou JF. Antibodies aganist malondialdehide-modified proteins, In: Free radicals antioxidant protocols. Amstrong D (eds), New Jersey, 1998: 111-118.

117. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects oflife-style factors. Clin Chem 1997; 47: 1209-1214.

118. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidans and nutrition. Nutr 2002; 18: 872-879.

119. Moreno IM, Mate A, Repetto G, et al. Influence of microcystin –LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. J Physiol Biochem. 2003; 59: 293-300.

120. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reproduc Biol Endocrinol 2005; 3: 43.

121. Erden M. Serbest radikaller. T Klin Tıp Bilimleri 1992; 12: 201-207.

122. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. Türk Biyokimya Dergisi 2007; 32: 104-111.

123. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. J Environ Sci Health Part C 2009; 27: 120-139.

124. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine.3 rd ed. London Oxford University Pres. Inc, 1999: p 267-274.

125. Müftüoğlu M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. Turk J Biochem 2003; 28: 20-24.

126. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bio Essays 2004; 26: 533-542.

127. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 2004; 73: 39-85.

128. Debeleç Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. J Fac Pharm 2006; 35: 149-170.

129. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet 1996; 347: 444-445.

130. Dizdaroglu M, Karakaya AE. Advances in DNA damage and repair. Kluwer Academic/Plenium Publishers, Newyork, 1999: p: 67-87.

131. Şenturkler S. Dizdaroglu M. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by GC/MS: How many modified bases are involved? Prepurification or not? Free Radic Biol Med 1999; 27: 370-380.

132. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17: 1195- 1214.

133. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem 2004; 266: 37–56.

134. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, et al. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. Mutat Res 2003; 531: 5-23.

135. Chen HI, Liou SH, Ho SF, et al. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. J Occup Health 2007; 49: 389-398.

136. Dinçer Y, Erzin Y, Himmetoğlu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 2007; 52: 1636-1641.

137. Hamurcu Z, Bayram F, Kahrıman G, et al. Micronucleus frequency in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine level in plasma of women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 2010; 26: 590-595.

138. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, et al. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. Mutat Res 2007; 619:113-123.

139. Pilger A, Rüdiger HW. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. Int Arch Occup Environ Health 2006; 80: 1-15.

140. Yokuş B, Çakır DÜ. *İn vivo* oksidatif DNA hasarı Biyomarkerı; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22: 535-543.

141. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, et al. The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Arch Toxicol 2011; 85: 873-899.

142. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis 2007; 28: 625-631.

143. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985; 147: 29-36.

144. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res 1993; 285: 35-44.

145. Fenech M, The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 2000; 455: 81-95.

146. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. Mutat Res 2006; 600: 58-66.

147. Hessel H, Radon K, Pethran A, et al. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs evaluation by the micronucleus assay. Mutat Res 2001; 497:101-109.

148. Labay K, Ould-Elhkim M, Kles V, et al. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. Teratog Carcinog Mutagen 2001; 21: 441-451.

149. Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, et al. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutat Res 2001; 489: 147-172.

150. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, et al. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. Mutagenesis 2001;16: 539-545.

151. Thomas P, Holland N, BolognesiI C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc 2009; 4: 825-837.

152. Wu J, Lyons GH, Graham RD, et al. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes

measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Mutat Res 2009; 24: 225-232.

153. Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. Health Phys 2010; 98: 234-243.

154. Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. Mutagenesis 2000; 15: 261-269.

155. Tawn EJ, Whitehouse CA. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. Mutat Res 2001; 490: 171-177.

156. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols 2007; 2: 1084-1104.

157. Jana M, Rajaram R, Rajaram A. Autoschizis of T-cells is induced by the nutritional supplement, Cr(III) picolinate. Toxicology in Vitro 2010; 24: 586-596.

158. Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T, et al. Chromium (III)-induced apoptosis of lymphocytes: death decision by ROS and Sre-family tyrosine kinases. Free Radic Biol Med 2002; 33: 1622-1640.

159. Yurtcu E, Ergun MA, Menevşe A. Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes. Cell Biol Int 2003; 27: 791-794.

160. Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T. Caspase-3: its potential involment in Cr(III)-induced apoptosis of lymphocytes. Mol Cell Biochem 2004; 259: 43-51.

161. Prasad SA, Küçük O. Zinc in cancer prevention. Cancer Metast Rev 2002; 21: 291-295.

162. Kelly FJ. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. JFCC 1988; 10: 21-23.

163. Jain SK, Rogier K, Prouty L, et al. Protective effects of 17β-estradiol and trivalent chromium on interleukin-6 secretion, oxidative stres, and adhesion of monocytes: relevance to heart disease in postmenopausal women. Free Radic Biol Med 2004; 37: 1730-1735.

164. Jain SK, Kanan K. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289: 687-691.

165. Jain SK, Patel P, Rogier K, et al. Trivalent chromium inhibits protein glycosylation and lipid peroxidation in high glucose-treated erythrocytes. Antioxid Redox Sign 2006; 8: 238-241.

166. Vinson JA, Mandarano MA, Shuta DL, et al. Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacin-bound chromium in a hamster atherosclerosis model. Mol Cell Biochem 2002; 240: 99-103.

167. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Liu JY, et al. Effects of chromium picolinate on glycemic control and kidney of the obese Zucker rat. Nutr Met 2009; 6: 51.

168. Tsou TC, Chen CL, Liu TY, et al. Induction of 8-hydroxy deoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. Carsinogenesis 1996; 17: 103-108.

169. Chang WC, Yu YM, Wu CH, et al. Reduction of oxidative stress and atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits by Dioscorea rhizome. Can J Physiol Pharmacol 2005; 83: 423-430.

170. Jana M, Rajaram A, Rajaram R. Chromium picolinate induced apoptosis of lymphocytes and the signaling mechanisms thereof. Toxic Applied Pharma 2009; 237: 331–344.

171. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and Enviroment, COM/04/S3. Statement on the mutagenicity of trivalent Cr and CrPic .http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/Com/chromium.htm, (24.12. 2013).

172. A.O.A.C. Offical Methods of Analysis of The Associaton of Official Analytical Chemists. 14th ed Inc Arlington, Virginia, 1984: p 22-30.

173. Carpenter KJ, Clegg KM. The metabolizable energy of poultry feeding stuffs in relation to their chemical composition. J Sci Feed Agric 1956; 7: 45-51.

174. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy–inducing agents using cytokinesis–blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environ Mol Mutgen 1989; 13: 34-43.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 11/08/2010 **Toplantı Sayısı:** 7 **Karar No:** 10/67

Etik kurul toplantısı 11/08/2010 tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nda **Prof.Dr:Zübeyde GÜNDÜZ** başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Edebiyat Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Yrd. Doç: Zuhal Hamurcu: " Krom Pikolant'ın Oksidatif ve Kromozomal DNA Hasarı Oluşumuna Etkisinin Belirlenmesi"adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Tarih : 11/08/2010

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr:Zübeyde GÜNDÜZ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Meryem (GÜLTEKİN) ŞENTÜRK

Uyruğu : Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 10 Kasım 1980, Kayseri

Medeni Durumu : Evli

Tel : +90 352 207 66 66 / 29723

Fax : +90 352 337 27 40

email: meryemgltkn@hotmail.com; meryemgultekin@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD 38039 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	ERÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü	Devam ediyor
Yüksek Lisans	ERÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü	2007
Lisans	ERÜ Fen Edebiyat Fakültesi	2003
Lise	Kayseri Anadolu Lisesi, Kayseri	1998

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011- Halen	ERÜ Veteriner Fakültesi	Öğretim Görevlisi
2007- 2011	ERÜ Veteriner Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2006–2007	ERÜ Merkez Laboratuvarı	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce