

# İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve $\beta$ -karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine in vitro etkileri

Yasemin Soysal\*, Feride İffet Şahin\*\*, Sevda Menevşe\*\*\*

\*Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Isparta

\*\*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Ankara

\*\*\*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Ankara

## Özet

Bu çalışmanın amacı, antioksidan etkileri bildirilmiş maddeler melatonin,  $\beta$ -karoten ve genotoksik bir madde olan Mitomisin C'nin (MMC) tek tek veya birlikte in vitro ortamda insan periferik kan lenfosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Sağlıklı 11 bireyin periferik kan lenfosit kültürlerinden Fluorescence Plus Giemsa (FPG) tekniği modifiye edilerek kardeş kromatid değişimi değerleri tespit edilmiştir. Melatonin ve  $\beta$ -karoten (beta-karoten) tek başlarına eklendikleri kültürlerle ve madde içermeyen kontrolle karşılaştırıldığında benzer KKD değerlerine sahip oldukları, melatonin ve  $\beta$ -karotenin birlikte kültürlerle eklenmeleri sonucu, madde içermeyen kontrol ve tek başlarına kullanıldıkları kültürlerin değerleri ile karşılaştırıldığında KKD değerlerinde farklılık oluşturmadıkları gözlenmiştir. MMC, beklenen KKD değerini artırma etkisini göstermiştir. Melatonin ve  $\beta$ -karoten tek başlarına ve birlikte kullanıldıkları durumda MMC'nin KKD'ni indükleyen etkisini azaltmıştır. MMC'nin tek başına kullanımındaki sonuçla karşılaştırıldığında melatonin,  $\beta$ -karoten ve MMC'nin birlikte kullanıldığı kültürde KKD oranı anlamlı düzeyde azalmıştır. MMC'nin KKD oluşumunu indükleyen etkisi karşısında  $\beta$ -karoten, KKD değerlerini melatonine kıyasla daha fazla azaltmış ve melatonin ile karşılaştırıldığında daha güçlü antimutajenik etki gösterdiği saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** kardeş kromatid değişimi, melatonin, beta-karoten, mitomisin C, genotoksik etki

## Abstract

### The in vitro effect of melatonin and $\beta$ -carotene on sister chromatid exchange frequency in mitomycin C-induced human blood lymphocytes

The aim of this study was to investigate the in vitro effects of melatonin,  $\beta$ -carotene (known as antioxidants) and Mitomycin C (MMC) (known as a genotoxic agent) separately and together on sister chromatid exchange (SCE) in human blood lymphocyte cultures. A total of 11 healthy human donors have been included in this research and their peripheral blood culture cells were processed by modified fluorescence plus Giemsa method to investigate sister chromatid Exchange frequency. The results indicate that melatonin and  $\beta$ -carotene (beta-carotene) alone and compared to untreated controls have similar incidence of SCE. Melatonin and beta-carotene together in the cell culture did not exhibit significant change in the frequency of SCE compared to the cultures they were alone and untreated controls. The lymphocytes, which were treated with mitomycin C (MMC), showed the expected increased incidence of SCE. Melatonin and  $\beta$ -carotene used together and alone decreased the MMC induced frequency of SCE. Melatonin,  $\beta$ -carotene and MMC together have significant decrease of SCE frequency when compared to MMC alone. We observed that, beta-carotene decreases the frequency of SCE more than melatonin. So, we concluded that beta-carotene showed stronger antimutagenic effect than melatonin according to the frequency of sister chromatid exchange.

**Key words:** sister chromatid exchange, melatonin, beta-carotene, mitomycin C, genotoxic effect

**Yazışma Adresi:** Yrd. Doç. Dr. Yasemin Soysal  
Basın Cad. Özdağ Sok. No:3/12 Keçiören 06010-Ankara  
Tel: 0542 3463576  
E-mail: yaseminankara@hotmail.com

## Giriş

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında genotoksik ajanların mutajenik ve karsinojenik etkisi ile karşılaşmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile birlikte üretilen yeni kimyasallar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları ve çevreye verilen atıklar canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma ihtimalini taşımaktadırlar. Bu nedenle mutajenik, karsinojenik, antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin etkilerinin araştırılması önem kazanmıştır (1). Genotoksik ajanların deoksiribonükleik asit'te (DNA) oluşturduğu hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan doğrudan metodlardan birisi kardeş kromatid değişimi (KKD) analizidir. Kardeş kromatid değişimi, kromozomun her iki kromatidinin homolog bölgelerinde DNA'da kırık oluşması ve kırılan bölgelerin yer değiştirip yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır (2-4). Mutajenik, karsinojenik ve klastojenik etkisi olan ajanların KKD değerlerini arttırdığı, antioksidan özellik gösteren ajanların da KKD değerini azalttığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (3-9). Çalışmamızda Mitomisin C (MMC), beta-karoten ve melatonin, test kimyasalları olarak kullanılmıştır. Mitomisin C (MMC), antimitotik etki gösteren ve kardeş kromatid değişimini artıran alkile edici bir antibiyotik ajandır ve hücredeki birincil hedefi DNA'dır (4,10-13). Diğer alkile edici ajanlar gibi pek çok kimyasal tepkime yaratır (14,15). MMC bir kez aktive olduğunda, DNA'yı adeninin N<sup>6</sup> atomundan, guaninin O<sup>6</sup>, O<sup>7</sup>, N<sup>2</sup> atomlarından alkile eder ve çapraz bağlanır. Bu çapraz bağlanmalar DNA sentezinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olur (16). Beta-karoten, sebze ve meyvelerde bulunan, insanların vitamin A'ya metabolize edebildikleri bir karotenoiddir.  $\beta$ -karotenin en önemli işlevlerinden birisi antioksidan özelliğidir (17-20). Melatonin, (N-Asetil-5-Metoksitriptamin), başlıca epifizden salgılanan bir hormondur, 1950'li yılların sonunda bulunmuştur, hücrede DNA'yı serbest radikallerin neden olduğu hasardan korur (21,22). Bu çalışmada amaç, MMC, melatonin ve beta-karotenin KKD değerleri üzerinde etkilerinin ve MMC'nin etkilediği KKD değerleri üzerinde melatonin ve beta-karotenin ayrı ayrı ve birlikte oluşturdukları etkilerin araştırılması ve karşılaştırılması olarak belirlenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Yaşları 28-40 arasında değişen belirli bir metabolik bozukluğu olmayan, ilaç kullanmayan, sigara ve alkol kullanmayan, çalıştığı ortamda mutajenlere maruz

kalmayan, sağlıklı 7 erkek ve 4 kadın toplam 11 bireyin heparinli periferik kan örnekleri bilgilendirilmiş olurları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Periferik kan kültürü yöntemiyle hastaların lenfositleri kültüre edildi. Kültürlerin 24. saatinde GTG bantlama için hazırlanan tüpler hariç, tüm tüplere 5-Bromo-2-deoksiüridin (BrdU), 48. saatte ise tablo 1' de belirtilen miktarlarda melatonin,  $\beta$ -karoten ve MMC ilave edildi. Eklenen maddelerin konsantrasyonları daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak belirlendi (10,13,23). Devam eden kültürler 68. saatte 0.1 ml kolşisin konularak sonlandırıldı, metafazların lam üzerine fiksasyonunu takiben GTG bantlama yapılarak kromozom sayı ve yapıları analiz edildi. KKD analizi için hazırlanan preparatlara Fluorescence Plus Giemsa (FPG) tekniği modifiye edilerek uygulandı (24). Her hücre kültürü için iyi dağılım gösteren ve KKD içeren en az 43 kromozoma sahip 20 metafaz alanı ışık mikroskopunda değerlendirildi (25). Kromatidlerde boyanmadaki renk sürekliliğinin bozulduğu, kromatidler arasında karşılıklı renk değişiminin olduğu her nokta bir kırık olarak değerlendirildi (1). Sonuçların istatistiksel analizi SPSS 8.0 programı kullanılarak Mann Whitney-U Testi ile  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

Tablo-1: Çalışılan her birey için hazırlanan kültür tüpleri, kültürlerle yapılan uygulamalar ve uygulanan maddelerin konsantrasyonları

| Kültür Tüpü No | Kültürlere yapılan uygulamalar | Uygulanan maddelerin konsantrasyonları          |
|----------------|--------------------------------|---|
| 1              | GTG Bantlama                   |   |
| 2              | Spontan KKD                    |   |
| 3              | Beta-karoten                   | 10 <sup>-6</sup> M                              |
| 4              | MLT                            | 0.15 mM   |
| 5              | MMC                            | 10 <sup>-7</sup> M                              |
| 6              | Etil Alkol                     | %96'lık çözeltiliden 5 µl                       |
| 7              | MMC + MLT                      | 10 <sup>-7</sup> M + 0.15 mM                    |
| 8              | MMC + BC                       | 10 <sup>-7</sup> M + 10 <sup>-6</sup> M         |
| 9              | BC + MLT                       | 10 <sup>-6</sup> M + 0.15 mM                    |
| 10             | BC + MLT + MMC                 | 10 <sup>-6</sup> M + 0.15 mM 10 <sup>-7</sup> M |

Melatonin: MLT, Beta-karoten: BC, Mitomisin C: MMC Konsantrasyonlar 5 ml besi yeri içinde son konsantrasyon olarak verilmiştir.

## Bulgular

Sağlıklı 11 birey için hazırlanan 100 hücre kültüründen elde edilen kromozomlar KKD açısından, 10 hücre kültürü ise sayısal ve yapısal anormallikler açısından değerlendirildi. Yapısal ve sayısal anomali değerlendirmesinde her birey için GTG bantlama ile boyanmış 15 metafaz alanı analiz edilerek tüm

bireylerin sayısal ve yapısal olarak normal karyotipe sahip oldukları saptandı, böylece KKD sıklığı oranları hesaplanırken değerlendirilen alanların kromozom sayılarının standart olması ve çalışılan bireylerde daha önce tanısı konmamış bir kromozomal kırık sendromunun olmadığı belirlenmiş oldu (10). Her kültür tüpü için incelenen metafaz sayıları, KKD sayıları, hücre başına ortalama KKD değerleri tablo-2'de belirtilmiştir.

Tablo-2: Çalışmada kullanılan maddeler, 11 bireyin 68 saatlik periferik kan kültürlerinde incelenen toplam metafaz sayısı, toplam KKD sayısı, maddelerin oluşturdukları KKD'lerin hücre başına ortalamaları

| Kültürlere yapılan uygulamalar | İncelenen metafaz sayısı | İncelenen KKD sayısı | KKD/hücre Ort±SS |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------|
| Spontan KKD                    | 220                      | 1776                 | 8.07 ± 1.23      |
| MLT                            | 211                      | 1695                 | 8.03 ± 0.58      |
| Beta-karoten                   | 220                      | 1781                 | 8.10 ± 0.86      |
| Etil Alkol                     | 220                      | 1900                 | 8.64 ± 1.0       |
| BC + MLT                       | 207                      | 1759                 | 8.53 ± 0.93      |
| BC + MLT + MMC                 | 166                      | 7054                 | 38.19 ± 7.67     |
| MMC + BC                       | 192                      | 7605                 | 39.50 ± 8.31     |
| MMC + MLT                      | 128                      | 5841                 | 40.59 ± 8.31     |
| MMC                            | 204                      | 9869                 | 47.42 ± 6.80     |

Hücre başına ortalama KKD: Toplam KKD sayısı / İncelenen toplam metafaz sayısı

Ort±SS: Ortalama±Standart sapma, melatonin: MLT, Beta-karoten: BC, Mitomisin C: MMC, MLT: 0.15 mM

Melatonin ve  $\beta$ -karotenin çözücüsü olarak kullanılan etil alkolün kontrol çalışmasında, KKD değerleri üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Etil alkolün oluşturduğu KKD değerleri, melatonin ve  $\beta$ -karotenin oluşturduğu KKD değerleri ile karşılaştırıldığında, sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). Spontan oluşan KKD değeri hücre başına ortalama  $8.07\pm 1.23$  iken 0.15 mM melatoninin kullanıldığı kültürlerde KKD değerlerinin ortalaması  $8.03\pm 0.58$  bulundu. 0.15 mM melatoninin hücre başına oluşturduğu KKD değerleri ile madde içermeyen kontrol çalışmasında kendiliğinden (spontan) oluşan KKD değerleri karşılaştırıldığında, melatoninin tek başına KKD oluşumuna etkisi olmadığı gözlemlendi ( $p>0.05$ ). Daha önce yapılmış bir çalışmada  $\geq 0.20$  mM melatoninin mitotik indekste azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (13). Bu nedenle, çalışmamız sonucunda da 0.15 mM melatoninin etkin doz olarak kullanılmasına karar verildi ve karşılaştırmalar bu konsantrasyon temel alınarak yapıldı.

Spontan oluşan KKD değerlerinin ortalaması ile MMC'nin oluşturduğu KKD değerleri karşılaştırıldığında MMC'nin kırık oluşumunda belirgin bir artışa neden olduğu gözlemlendi ( $p<0.001$ ). MMC'nin tek başına kullanıldığı kültür ile MMC'nin melatonin ile birlikte kullanıldığı kültürün KKD

değerleri karşılaştırıldığında melatoninin MMC'nin indüklediği KKD değerlerini azalttığı gözlemlendi ( $p<0.05$ ).  $\beta$ -karotenin tek başına oluşturduğu KKD değerleri ile madde içermeyen kontrolün KKD değerleri karşılaştırıldığında,  $\beta$ -karotenin tek başına KKD değerleri üzerinde etkisi olmadığı gözlemlendi ( $p>0.05$ ).  $\beta$ -karoten, MMC ile birlikte kullanıldığında, MMC'nin KKD oluşumunu artırıcı etkisini azalttı. MMC'nin tek başına kullanılması sonucu oluşan KKD değerleri ile MMC'nin  $\beta$ -karotenle birlikte kullanılması sonucu azalan KKD değerleri karşılaştırıldığında sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ).  $\beta$ -karotenin melatonin ile birlikte kullanıldığı kültürün KKD değerleri ile  $\beta$ -karotenin tek başına kullanıldığı kültürün KKD değerleri karşılaştırıldığında iki maddenin birbirlerinin antioksidan etkilerini arttırmadığı gözlemlendi ( $p>0.05$ ).  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanılması sonucunda oluşan KKD değerleri ile spontan KKD değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). MMC,  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanılması sonucunda,  $\beta$ -karoten ve melatonin, MMC'nin KKD'ni arttıran etkisini azalttı. MMC tek başına kullanıldığında hücre başına  $47.42\pm 6.80$  ortalama KKD oluşturuyor iken MMC'nin  $\beta$ -karoten ve melatonin ile birlikte kullanılması sonucunda hücre başına  $38.19\pm 7.67$  ortalama KKD değeri gözlemlendi ( $p<0.01$ ). Melatonin, MMC ve  $\beta$ -karotenin birlikte kullanıldığı kültürün KKD değerleri ile MMC ve melatoninin kullanıldığı kültür karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı ( $p>0.05$ ). Melatonin, MMC ve  $\beta$ -karotenin birlikte kullanıldığı kültürün KKD değerleri ile MMC ve  $\beta$ -karotenin birlikte kullanıldığı kültür karşılaştırıldığında KKD değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ( $p<0.05$ ). Kadınlar ve erkekler arasında KKD açısından anlamlı fark bulunmadı.

### Tartışma

Kardeş kromatid değişimi (KKD) analiz yöntemi, mutajenler ve karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede etkili yöntemlerden biridir. KKD analiz yöntemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemenin yanı sıra mutajenler tarafından oluşturulan kromozom hasarının, antioksidan etkisi olduğu bilinen veya araştırılan maddeler tarafından ne oranda tamir edildiği hakkında da bilgi vermektedir (2,3,4,26,27).

Bu çalışmada, antioksidan etkisi olduğu bilinen

melatonin ve  $\beta$ -karotenin KKD sıklığı üzerinde ne oranlarda etkili olduklarını göstermek ve bu maddelerin sitotoksik olduğu bilinen Mitomisin C üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmamız,  $\beta$ -karotenin ve melatoninin çözücüsü olarak bizimle aynı miktarlarda etil alkolün kullanıldığı diğer çalışmaların, etil alkolün KKD sıklığı üzerine etkisi olmadığı yönündeki verilerini desteklemektedir (10,13).

Çalışmamızda kadınlar ve erkekler arasında KKD sıklığında anlamlı fark bulunmaması bu konudaki yayınları desteklemektedir (28). Ancak bazı yayınlarda ikinci X kromozomu nedeniyle KKD sıklığının kadınlarda hücre başına 0.5 KKD oranında arttığı belirtilmiştir (29,30).

Melatonin antioksidan etkisi bildirilmiş bir maddedir (31). Melatoninin organizmadaki her hücre için, çekirdekte ve aynı zamanda sitoplazmada hücreyi serbest radikallerin tahrip edici etkisinden korumada fonksiyonel önemi vardır. Melatoninin serbest radikalleri doğrudan nötralize etmenin yanında, aynı zamanda glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesini uyararak oksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (22,32). Vijayalaxmi'nin yaptığı çalışmada 0.20mM melatoninin oluşturduğu ortalama KKD sıklığı  $7.0 \pm 0.10$  bulunmuştur (13). Bizim çalışmamızda ise 0.15mM konsantrasyonu için ortalama KKD sıklığı  $8.03 \pm 0.58$  olarak bulunmuştur. Bulgularımız melatoninin spontan KKD değerleri üzerinde etkisi olmadığı yönündeki daha önceki çalışmayı desteklemektedir (13). Çalışmamızda, MMC'nin eklendiği kültürün KKD değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir.  $10^{-7}$  M MMC'nin kullanıldığı kültürdeki KKD değeri ile spontan KKD değeri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Normal bireylerde MMC ile yapılan KKD analizi çalışmalarının tümünde KKD değerinin arttığı gözlenmiştir (10,12,13,23,33). MMC için  $10^{-7}$  M derişimini, aynı özelliklere sahip bireylerin lenfosit kültürlerinde kullanan araştırmacıların sonuçları ile bizim sonuçlarımız karşılaştırıldığında, KKD oranlarındaki sayısal farklılık laboratuvarlar arasındaki yöntem değişikliğinden kaynaklanmakla beraber tüm çalışmaların ortak özelliği MMC'nin KKD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olmasıdır (10,13,23).

MMC'nin melatonin ile birlikte kullanıldığı kültürün KKD değerleri ile MMC'nin tek başına kullanıldığı kültürün KKD değerleri karşılaştırıldığında, melatoninin MMC'nin indüklediği KKD oranını azalttığı gözlenmiş, karşılaştırmanın sonucu

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Melatonin, sitotoksik bir ajan olarak bilinen MMC'nin kromozomlarda oluşturduğu hasarı serbest radikalleri engelleyici etkisi ile azaltmaktadır. Endojen olarak üretilen yanı sıra ekzojen olarak verilen melatoninin de hücreler tarafından alındığı ve çekirdekte biriktiği düşünülmektedir. Melatoninin çekirdekte özel bağlanma bölgelerine bağlandığı ve pek çok hücrede genomik etkisinin olduğu ve direkt DNA'ya bağlandığı düşünülmekte, heterokromatin proteinlerine bağlanabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır (34). Melatoninin gama-radyasyonu nedeniyle oluşan genetik değişikliklere karşı etkisini insan periferik kan lenfositlerinde KKD yöntemiyle araştıran bir çalışmada genotoksik etkisinin olmadığı ve radyasyona karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (35). Kurşun maruziyeti nedeniyle ortaya çıkan DNA hasarını engellemeye yönelik antioksidanların bulunması çalışmalarında melatoninin KKD açısından etkisi araştırıldığında kurşun nedeniyle artmış KKD oranını anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur (31).

$\beta$ -Karoten, serbest radikalleri etkisiz hale getirmektedir.  $\beta$ -karotenin antioksidan etkisi, peroksil radikalini engelleyerek karbon merkezli radikal oluşturması ve bunun da oksijenle geriye dönüşümlü olarak tepkimeye girmesine bağlanmaktadır.  $\beta$ -Karoten, DNA çift zincirinin replikasyon sonrası tamir kapasitesini arttırarak DNA hasarını baskılamaktadır (36,37).

Çalışmamızda  $\beta$ -karoten, tek başına kültüre eklendiğinde madde eklenmemiş kontrolün spontan KKD değerlerinden farklı bir KKD oranı göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu sonuçlar,  $\beta$ -karotenin tek başına ilave edildiği kültürde KKD değerleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren daha önceki raporları desteklemektedir (10). Oksidatif stres altında rat hepatositlerinde beta-karotenin tek başına kullanıldığı KKD çalışmasında sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmezken, beta-karotenin parçalanma ürünlerinin ve apo-8'-beta-karotenal'in kullanılması sonucunda genotoksik etkinin olduğu gösterilmiştir. Hipoksi/reoksijenasyon tarafından uyarılan oksidatif streste beta-karoten eklenmesinin beta-karoten parçalanma ürünlerini oluşturduğu ve bununla birlikte genotoksitenin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, beta-karotenin klinik etkisi ve kanserden korunma çalışmalarında çelişkili sonuçlar vermesini açıklamaya yardımcı sonuçlar sunmaktadır (38). Çalışmamızda,  $\beta$ -Karoten, MMC ile birlikte kullanıldığında, MMC'nin KKD oluşumunu arttırıcı



etkisini azaltmıştır. MMC'nin tek başına kullanılması sonucu oluşan KKD değerleri ile MMC'nin  $\beta$ -karotenle birlikte kullanılması sonucu azalan KKD değerleri karşılaştırıldığında sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).  $\beta$ -Karotenin MMC üzerindeki etkilerini fare kemik iliğinden elde edilen kromozomlarda araştıran araştırmacıların bulgularında da  $\beta$ -karotenin antioksidan etkisi gözlenmiştir (14). Bulgularımız,  $\beta$ -karotenin MMC'nin KKD oluşumu üzerindeki etkisini azalttığını bildiren daha önceki çalışmayı desteklemektedir (10).

Çalışmamızda antioksidan etkileri bilinen  $\beta$ -karoten ve melatoninin KKD oluşumuna etkileri hem kendi aralarında hem de MMC ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yaptığımız araştırma ve literatür taramaları sonucuna göre melatonin ve beta-karotenin biyokimyasal açıdan beraber değerlendirildiği çalışmalar olmakla birlikte daha önce melatonin ve  $\beta$ -karotenin KKD üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır (39,40,41).

Melatoninin  $\beta$ -karoten ile birlikte kullanıldığı kültürün KKD değerleri ile  $\beta$ -karotenin tek başına kullanıldığı kültürün KKD değerleri karşılaştırıldığında iki maddenin birbirlerinin antioksidan etkilerini arttırmadığı gözlenmiştir. Karşılaştırmanın sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Melatonin ve  $\beta$ -karoten tek başına buldukları kültürlerde, KKD'yi indükleyici bir madde bulunmadığında KKD oluşumu üzerine herhangi bir etki oluşturmamaktadırlar, dolayısıyla KKD oluşumunu indükleyen bir maddenin olmadığı kültürde birlikte bulunmaları, istatistiksel anlamda bir etki oluşturmamaktadır.

MMC,  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanılması sonucunda;  $\beta$ -karoten ve melatonin, MMC'nin KKD'yi indükleyen etkisini azaltmıştır. MMC tek başına kullanıldığında hücre başına  $47.42 \pm 6.80$  ortalama KKD oluşturuyor iken MMC'nin  $\beta$ -karoten ve melatoninle birlikte kullanılması sonucunda hücre başına  $38.19 \pm 7.67$  ortalama KKD değeri gözlenmiş, sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

MMC,  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanılması sonucunda oluşan KKD değerleri ile MMC+melatonin ve MMC+ $\beta$ -karotenin birlikte kullanılmaları sonucu oluşan KKD değerlerinin karşılaştırılmasında ise üç maddenin birlikte kullanıldığı durumda  $\beta$ -karotenin antioksidan etkisini daha fazla gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgumuz, hayvan deneyinde çeşitli maddeler arasında melatoninin ve  $\beta$ -karotenin antimutajenik

etkilerinin karşılaştırıldığı daha önce yapılmış çalışmayı desteklemektedir (42).

$\beta$ -karotenin MMC ile birlikte kullanıldığında KKD'yi anlamlı düzeyde azalttığı daha önce bildirilmiştir (10).  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanıldığı durumda da KKD değerlerini anlamlı düzeyde azalttıkları gözlenmiştir.  $\beta$ -karoten ve melatoninin tek tek kullanıldığında MMC ile indüklenmiş KKD'yi anlamlı düzeyde düşürdüğü göz önüne alındığında birlikte kullanımda aldığımız sonuç beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın spontan KKD değerleri ile  $\beta$ -karoten ve melatoninin birlikte kullanıldığında elde edilen değerler kıyaslandığında bulunan farkın anlamlı olmaması nedeniyle her iki maddenin de sadece indüklenmiş KKD'yi azaltıcı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

İn vitro olarak yaptığımız çalışmamızın sonucunda,  $\beta$ -karoten ve melatoninin antioksidan etkileri olduğu, melatonin ve  $\beta$ -karotenin birlikte kullanılmalarının genotoksisiteye karşı artan bir koruyucu etkilerinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Melatonin ve  $\beta$ -karoten, mutajen bir maddeye maruz bırakılmış lenfosit kültürlerinde antioksidan bir madde olarak kullanıldıklarında,  $\beta$ -karotenin KKD sıklığında melatonine göre daha etkili olduğu gözlenmiştir.  $\beta$ -karotenin daha güçlü bir antioksidan olduğunu öneren çalışmaları bu bulgularımız desteklemektedir (42).

Sonuç olarak, melatoninin ve  $\beta$ -karotenin antimutajenik etkilerinin in vivo ve in vitro sistemlerde farklı mutajenite testleri ve farklı mutajen maddeler kullanılarak test edilmesi, bu iki maddenin antioksidan olarak kullanılmalarının yaygınlaştırılması aşamasında mekanizmalarının ve etkilerinin anlaşılması açısından yararlı olacaktır.

#### Kaynaklar

1. Stich HF, Dunn BP. Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. Int J Cancer 1986; 38: 713-717
2. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutat. Res 1988; 204: 379-406
3. Perry PE, Thomson EJ. The methodology of sister chromatid exchanges. In: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C. Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, 1984; 495-529
4. Emre S. Antikanser ilaçların ve karsinojen maddelerin insan kromozomları üzerine etkilerinin in vitro sistemde kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange, SCE) analiz yöntemi ile belirlenmesi. Doktora,

- Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 1989.
5. Van Rensburg CEJ, Theron A, Richards GA, Van der Merwe CA, Anderson R. Investigation of the relationship between plasma levels of ascorbate, vitamin E and  $\beta$ -Carotene and the frequency of sister chromatid exchanges and release of reactive oxidants by blood leucocytes from cigarette smokers. *Mutat Res* 1989; 215: 167-172
  6. Manoharan K, Banerjee MR.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports* 1985; 9(9): 783-789
  7. Bianchi L, Tateo F, Pizzala R, Stivala LA, Verri GM, Melli R, Santamaria L. Carotenoids reduce the chromosomal damage induced by bleomycin in human cultured lymphocytes. *Anticancer Research* 1993; 13: 1007-1010
  8. Konopack M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and  $\beta$ -carotene against gamma-ray induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res* 1998; 417: 85-94
  9. Salvadori DMF, Ribeiro LR, Oliveira MDM, Pereira CAB, Beçak W. The protective effect of  $\beta$ -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res* 1992; 265: 237-244
  10. Bal F, Şahin Fİ, Yirmibeş M, Balcı A, Menevşe S. The in vitro effect of  $\beta$ -carotene and mitomycin C on SCE frequency in Down's Syndrome lymphocyte cultures. *Tohoku J Exp Med* 1998; 184(4): 295-300
  11. Yamagata Z, Lijima S, Takashita T, Ariizumi C, Higurashi M. Mitomycin C induced sister chromatid exchanges and cell cycle kinetics in lymphocytes from patients with Klinefelter Syndrome. *Mutat Res* 1989; 212: 263-268
  12. Holman A, Karlsson A, Bratt I, Högstedt B. Micronuclei and mitotic index in B-, T4- and T8- cells treated with mitomycin C and  $\gamma$ -Irradiation. *Mutat Res* 1994; 309: 93-99
  13. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Leal BZ, Meltz ML. Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 351: 187-192
  14. Raj AS, Katz M.  $\beta$ -Carotene as an inhibitor of benzo(a)pyrene and mitomycin C induced chromosomal breaks in the bone marrow of mice. *Can J Genet Cytol* 1985; 27(5): 598-602
  15. Bianchi NO, Bianchi MS, Larramendy M. Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity. *Mutat Res* 1979; 63: 317-324
  16. Chapner BA, Myers CE. Antitumor Antibiotics, Cancer. In: De Vita, VT, Hellman S, Rosenberg SA. Principles and Practice of Oncology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1993; Vol.2, 381.
  17. Richards GA, Theron AJ, Van Rensburg EC, Van Rensburg JA, Van der Merwe CA, Kuyl MJ, Anderson R. Investigation of the effects of oral administration of vitamin E and  $\beta$ -carotene on the chemiluminescence responses and the frequency of sister chromatid exchanges in circulating leucocytes from cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 648-654
  18. Xue K-X, Wu J-Z, Ma G-J, Yuan S, Qiu H-L. Comparative studies on genotoxicity and antigenotoxicity of natural and synthetic  $\beta$ -carotene stereoisomers. *Mutat Res* 1998; 418: 73-78.
  19. Schwartz JK. In vitro biological methods for determination of carotenoid activity. *Methods Enzymol* 1993; 214: 226-256
  20. Ziegler RG. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancer. *Am J Clin Nutrition* 1991; 53: 251-259
  21. Brzezinski A. Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336(3): 186-195
  22. Pelaez AM, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; 15: 59-69
  23. Ekmekçi A, Şaylı A, Dönmez H, Bal F. In vitro effects of prostaglandin E1 and indomethacin on mitomycin C induced human lymphocytes. *Mutat Res* 1995; 328: 49-53.
  24. Perry PE, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251-56.
  25. Ekmekçi A, Şaylı A. Cytogenetic study of tuberculosis patients before and after tuberculostatic drug treatment. *Mutat Res* 1995; 34: 175-183.
  26. Verma RS, Babu A. Human Chromosomes: Principles and Techniques, (Second Ed) United States of America, McGraw-Hill, Inc., 1995; 143-151.
  27. Howell RT, Taylor AHK. Chromosome instability syndromes. In: Rooney DE, Czepulkowski BH. Human Cytogenetics: A Practical Approach, New York, Oxford University Press, 1992; Vol 2: 209-233
  28. WHO. Guide lines for the study of genetic effects in human populations. *Environmental Health Criteria*, Geneva, World Health Organisation, 1985; 46:45-55
  29. Carrono AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988; 204: 379-406
  30. De Flora S, Ramel C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, classification and overview. *Mutat Res* 1988; 202: 285-306
  31. Ustundag A, Duydu Y. The influence of melatonin and N-acetylcystein in delta-aminolevulinic acid and lead induced genotoxicity in lymphocytes in vitro. *Biol Trace Elem Res* 2007; 117(1-3): 53-64
  32. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents

- cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10(8): 882-90
33. Rajas E, Montero R, Herrera LA, Sardo M, Gonsebatt ME, Radrigues R, Ostrosky-Wegman P. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutat Res* 1992; 282: 283-286.
  34. Rachel AJ, Sharma T, Menan VV. Harlequin banding and localisation of sister chromatid exchanges. *Mutat Res* 1991; 264: 71-80
  35. Kopjar N, Miocic S, Ramic S, Milic M, Viculin T. Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma-rays in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006; 57(2): 155-63
  36. Van der Rensburg CEJ, Theron A, Richards GA, Van der Merwe CA, Anderson R. Investigation of the relationship between plasma levels of ascorbate, vitamin E and  $\beta$ -carotene and the frequency of sister chromatid and rRelease of reactive oxidants by blood leucocytes from cigarette smokers. *Mutat Res* 1989; 215: 167-172
  37. Sarkar A, Başak R, Bishayee A, J, Chatterjee M. Beta-carotene inhibits rat liver chromosomal aberrations and DNA chain break after a single Injection of diethylnitrosamine. *Br J Cancer* 1997; 76(7): 855-61
  38. Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siems W, Eckl PM. Cyto-and genotoxic potential of beta-carotene and cleavage products under oxidative stres. *Biofactors* 2005;24(1-4): 159-63
  39. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y, Aslan A. Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol Toxicol* 2007; Sep.2, online.
  40. Sadir S, Deveci S, Korkmaz A, Oter S. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(5): 521-6
  41. Yıldırım I, Korkmaz A, Oter S, Ozcan A, Oztas E. Contribution of antioxidants to preventive effect of mesna in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54(5): 469-73
  42. Oyanagui Y. Natural antioxidants enhance and prolong the oxyradical/no-related suppression by dexamethasone of ischemic and histamine paw edema in mice. *Inflammation* 1997; 21(6): 643-654