



Ektoinin İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksik Potansiyeli

Genotoxic Potential of Ectoine in Human Lymphocyte Cells

Selçuk Çeker* 

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ağrı, Türkiye

Öz

Ektoin (EKT), halofil bakterilerin stres faktörlerine karşı olarak ürettiği bir ozmoprotektandır. Bu amino asit türevi madde, doğal proseslere müdahale etmeden yüksek konsantrasyonlarda hücreler içinde birikebilir ve hücrenin radyasyona ya da ozmotik strese karşı korunmasına yardımcı olabilir. EKT, farklı alanlardaki yoğun uygulamalarından dolayı bilim adamlarının ilgisini kazanmaktadır. Bu çalışmada, insan lenfosit hücrelerini kullanarak, EKT'nin genotoksik ve anti-genotoksik potansiyellerini incelemeyi amaçladık. Sonuçlar, EKT'nin güçlü antigenotoksik özelliğe sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca bulgularımız NaN_3 'e maruz bırakılan insan lenfosit hücrelerinde gözlemlenen koruyucu etkinin, EKT'nin antioksidatif özellikleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ektoin, Genotoksisite, Komet testi, Lenfosit hücreleri

Abstract

Ectoine (ECT) is an osmoprotectant produced by halophilic bacteria in response to stressful factors. This amino acid derivative material can accumulate inside cells at high concentrations without interfering with natural processes and can protect the cell against radiation or osmotic stress. ECT is receiving increasing awareness by the scientific community because of its multiple applications. In the present study, we aimed to investigate the genotoxic and anti-genotoxic potencies of ECT by using human lymphocytes cells. The results showed that ECT has strong anti-genotoxic properties. Also, our findings suggest that protective effects of ECT in human lymphocytes cells subjected to NaN_3 may be related to antioxidative properties of the ECT.

Keywords: Ectoine, Genotoxicity, Comet Assay, Lymphocytes Cells

1. Giriş

Canlıların çoğu, kuraklık veya aşırı sıcaklık gibi çevresel faktörlerin neden olduğu strese karşı kendilerini koruyacak mekanizmalar geliştirmiştir. Özellikle ekstrem şartlarda yaşayan bakteriler; hücresel proseslerini etkilemeyen, ozmoprotektan olarak bilinen küçük moleküler ağırlıklı bileşikler üretebilirler (Bownik ve Stępniewska 2016). Bu moleküllerin hücre içinde birikmeleriyle, hücrelerin ozmotik dengesi korunur ve bu sayede hücrelerin dehidrasyonları önlenir (Pastor vd. 2013). Ozmoprotektanlar, su moleküllerini kuvvetle bağlar ve makromolekülleri dengeler. Etki mekanizmaları tamamen bilinmemekle birlikte, nasıl hareket ettiklerini açıklayan birkaç hipotez vardır. Ozmoprotektanların sulu bir solüsyonda makromolekül ile direkt olarak etkileşime girmediği, makromolekülün hidrasyonunu

artırarak yığın bölgesine ittiği ve böylece denatürasyonu önlediğini ileri süren “tercihli dışlama modeli” en fazla kabul gören hipotezdir (Arakawa ve Timasheff 1985, Moelbert vd. 2004, Yu vd. 2007). Ozmoprotektanlar; Şekerler (trehaloz, sakaroz), Polioller (gliserol, sorbitol, mannitol, alfa glikozil-gliserol, mannozil gliserol, mannozil gliseamid), N-asetillenmiş diamino asitler (N-asetilglutaminilglutamin amid), Betainler (glisin, betain ve türevleri) ve Amino asitler (prolin, glutamat, glutamin, alanin, ektoin ve hidroksi-ektoin) ile türevleri olmak üzere birkaç yapısal gruba ayrılmaktadır (Pastor vd. 2010).

İlk kez bir halofil bakteri türü olan *Ectothiorhodospira halochloris*'ten elde edilen Ektoin (EKT) (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine carboxylic acid) doğal bir zwitteriyonik (çift kutuplu), düşük molekül ağırlıklı ve kuvvetli su bağlayıcı organik bir moleküldür. Bu amino asit; ekstrem koşullar altında hayatta kalabilmek için aerobik, kemoheterotrof ve halofilik bakteriler tarafından üretilir (Nagata ve Wang 2001, Bownik ve Stępniewska 2015a).

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: selcukceker06@gmail.com

EKT, farklı stres şartlarına maruz bırakılan hücre zarlarının ve moleküllerin stabilitesini artırır. Yapılan çalışmalarda EKT'nin hücre duvarında birikmesiyle, hipertermiye karşı bakteri hücre zarlarını, enzimleri ve nükleik asitleri koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca EKT'nin; ısıtma, üre, dondurma ve kurutma ile dondurarak-çözölmeye karşı duyarlı fitaz, laktik dehidrogenaz (LDH) ve fosfofruktokinaz (PFK) enzimlerinin kararlılığını artırdığı gösterilmiştir (Göller ve Galinski 1999, Knapp vd. 1999, Zhang vd. 2006).

EKT, yaşlanmayı geciktirici ve cilt bakım özellikleriyle kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Krutmann 2000, Graf vd. 2008). Son zamanlarda EKT, akciğer iltihabı (Sydlik vd. 2009), kalın bağırsak iltihabı (Abdel-Aziz vd. 2013) ve Alzheimer (Kanapathipillai vd. 2005) gibi hastalıklarda potansiyel tıbbi değere sahip olması nedeniyle giderek cazip hale gelmiştir.

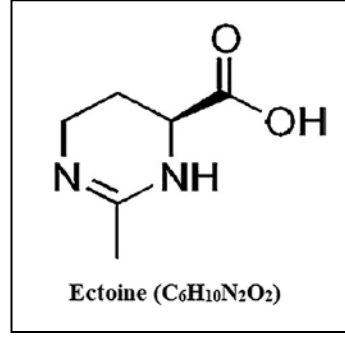
Tek hücre jel elektroforez (KOMET) testi, ökaryotik hücrelerde DNA hasarının analizi için güçlü bir genetik test olarak kullanılmaktadır (Tice vd. 2000). Komet testi; DNA tek ve çift sarmal kırıkları, abazik bölgeler, tamamlanmamış DNA tamir bölgeleri ve genomik DNA'daki yapısal değişiklikler gibi birçok DNA hasarının saptanmasında kullanılan hassas bir genotoksisite testidir (Tice vd. 2000). Bu test sistemi; bakteriler, funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler, omurgalılar ve hayvanlar üzerinde çok rahat uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından izleyebilme hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir yöntemdir (Dhawan vd. 2009).

EKT'nin belirtilen pek çok olumlu özellikleriyle birlikte, yüksek maliyetine (1000 \$ / kg) (Strong vd. 2016) rağmen özellikle kozmetikte nemlendirici özelliği sayesinde bilinçsizce ve aşırı tüketilmesi (yaklaşık 15000 ton / yıl) (Strong vd. 2016) insan sağlığı için tehlike oluşturabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda; EKT'nin genotoksik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, EKT'nin *in vitro* olarak insan lenfosit hücrelerinde sodyum azit (NaN_3)'e karşı anti-genotoksik etkisi KOMET testi ile araştırılmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Ektoinin Temin Edilmesi

Halomonaselongata tarafından üretilen saf EKT (≥ 99 saflık) Sigma-Aldrich'den satın alınmıştır. EKT suda iyi çözöndüğünden stok çözeltileri saf su ile hazırlanmıştır. EKT'nin açık ve kimyasal formülleri Şekil 1.'de belirtilmiştir.



Şekil 1. EKT'nin açık yapısı ve kimyasal formülü (Yao vd. 2013).

2.2. KOMET Testi

Tek hücre jel elektroforezi (SCGE: Single cell gel electrophoresis) olarak bilinen komet testi fiziksel ve kimyasal ajanların neden olduğu DNA hasarının ölçülmesinde son derece hassas, basit ve güvenilir bir metottur (Gyori vd. 2014). Komet testi hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanmaktadır (Kurtulmuş ve Aydın 2007). Komet testinin, birçok avantajı bulunmakla birlikte en önemlileri, en düşük seviyedeki DNA hasarlarını dahi ayırt edebilmesi, gereksinim duyulan hücre sayısının az olması, değişik hücre ve dokulara uygulanabilir olması, hızlı sonuç vermesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak saptanmasına olanak sağlamasıdır (McArt vd. 2010). Komet testi; ekotoksikoloji, biyoizlem çalışmaları, klinik çalışmalar, radyasyon biyolojisi, besinsel çalışmalar ve kanser çalışmaları gibi pek çok alanda DNA hasarı ve tamirini ölçmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Gyori vd. 2014). Komet test sistemi için Singh vd. (1988) protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.2.a. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Boyama çözeltilisinin hazırlanması

Önce stok etidyum bromür çözeltilisi hazırlandı. Bunun için, 10 mg etidyum bromür 50 mL distile suda çözöndürölüp, çözeltili şişesi alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklandı. Stok boyama çözeltilisi kullanılacağı zaman 1/9 oranında distile su ile seyreltilirdi. Hazırlanan seyreltik boyama çözeltilisi de folyoya sarılarak karanlıkta saklandı.

Elektroforez tamponunun hazırlanması

200 g NaOH'u 500 mL distile suda çözürek stok NaOH çözeltilisi hazırlandı. Buna ilave olarak, 14,89 g EDTA 200 mL distile suda çözölmeye sokularak stok EDTA çözeltilisi hazırlandı. Bu iki stok çözeltili oda sıcaklığında saklandı. Bir ölçek elektroforez tamponu için 30 mL NAOH çözeltilisi, 5 mL EDTA çözeltilisi karıştırılarak son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Tampon pH'ının 13'ten fazla olması sağlandı.

Fosfat hamponunun hazırlanması

PBS tableti 990 mL distile suda çözündürülüp, pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında bekletildi.

Nötralizasyon tamponunun hazırlanması

48.5 g Tris (0.4 M) tartılıp 800 mL distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltinin pH'ı HCL ile 7,5'a ayarlandı ve son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Stok lizis çözeltisinin hazırlanması

146.1 g NaCl (2.5 M), EDTA 37.2 g (100 mM) ve Tris 1.2 g (10 mM) 900 mL distile suya konularak ve çözünmesi için karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 10 M NaOH ile pH= 10'a ayarlanarak oda sıcaklığında saklandı. Stok lizis çözeltisi kullanılmadan önce her 100 mL hacim için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edildi.

2.2.b. Döner Seçimi

Bu çalışmada 25 - 30 yaş aralıklarında, sigara kullanmayan ve son 6 ay içerisinde her hangi bir nedenle antibiyotik almayan, X-Ray uygulanmayan, akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edilen 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte 5'er ml kan alındı.

2.2.c. Lenfosit İzolasyonu

Lenfositler ficol fansite santrifüleme yöntemiyle heparize kandan izole edildi. İlk olarak 1 ml periferik kan heparinize tüp içine alındı. Bir santrifüj tüpü kullanılarak PBS ile eşit miktarda kan seyreltildi. Üzerine 600 µL histopaque eklendi. Tüp 800 g'de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. En üstteki serum tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra bir alttaki bulutumsu görünümde olan tabaka dikkatli şekilde boş falkon tüpüne alınarak ve 5 mL PBS ile karıştırıldı. Tüp 2500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün altında kalan hücre pelleti tüpün alt kısmına sertçe vurularak tekrar çözündürüldü. Daha sonra tüp 1 ml RPMI-1640 medium ile dolduruldu. Tüp yavaşça karıştırıldı. Steril pipet kullanılarak 10 µL (yaklaşık 10.000 lenfosit) örnek bir tüpe alındı. Bu tüpe 20 µL tripan mavisi solüsyonu eklendi ve hemositometreye yüklenerek hücre sayısı hesaplandı.

2.2.d. Slaytların Hazırlanması

Slaytlar çalışmadan 1 gün önce hazırlandı. Lamlar sabunlu

suyla iyice steril edildi. Lamlar durulandıktan sonra metanolden geçirildi. 50 ml PBS çözeltisinde %1,0'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) hazırlandı. NMA tam çözünmesi amacıyla mikrodalga fırında kısa bir süre bekletildi. Mikrodalga fırından çıkartılan NMA'dan lam üzerindeki her bir kuyucuğa 80 µl damlatıldı. Bu haliyle çalışmada kullanılmak üzere oda sıcaklığında neme maruz kalmayacak şekilde kapalı ortamda bekletildi. 50 ml PBS çözeltisinde %1,0'lik düşük erime dereceli agaroz (LMA) hazırlandı. Hazırlanan LMA çözeltisi 5 ml'lik hacimlerle falkon tüplerine konuldu ve +4°C'de saklandı.

2.2.e. Deney Düzeneginin Oluşturulması

Her bir konsantrasyon için 1 mL fetal sığır serumu (FBS) içermeyen besiyeri hazırlanarak ependorflara konuldu. Daha sonra besiyeri içerisine aşağıda belirtilen maddeler eklendi. Bu deney düzenegi 4 paralel olarak tekrarlandı.

Kültür 1: Besiyeri + Lenfosit

Kültür 2: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃

Kültür 3: Besiyeri + Lenfosit + 100 µg/mL EKT

Kültür 4: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 10 µg/mL EKT

Kültür 5: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 25 µg/mL EKT

Kültür 6: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 50 µg/mL EKT

Kültür 7: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 100 µg/mL EKT

Kültür 8: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 250 µg/mL EKT

Kültür 9: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 500 µg/mL EKT

Kültür 10: Besiyeri + Lenfosit + 5 µM NaN₃ + 1000 µg/mL EKT

Ependorflar 37°C'de 3 saat kapalı hücre kültürüne alındı. Lenfositler inkübasyondan çıkarıldıktan sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları atıldı. Pellet 100 µL PBS içerisinde süspanse edildi. 5 ml'lik hacimlerle falkon tüplerine konmuş olan %1,0'lik LMA çözeltisi buzdolabından çıkartılıp mikrodalga fırında çözünmesi sağlandı. Çözünen LMA 37°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra LMA çözeltisinden 100 µL alınarak 100 µL PBS içerisinde süspanse edilen pellete eklendi.

Agar katılaşmadan hemen pipetaj yapılarak lenfositlerle karıştırıldı. Bu son karışımdan 80 µL alınarak önceden hazırlanmış olan slaytlara yayıldı. Üzeri lamelle kapatılıp 10 dakika buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkartılan slaytların üzerinden lamel yavaşça kaldırılarak 90 µL LMA eklendi. Tekrar lamelle kapatılan slaytlar 25 dakika kurumaya bırakıldı. Slaytlar kuruduktan sonra lameller dikkatlice kaldırılıp dikey cam şaleye yerleştirilir. Tüm slaytları kaplayacak şekilde lizis (çözündürme) çözeltisi eklenerek şalenin ağzı parafilmle kapatıldı. Bu haliyle buzdolabında 3 saat bekletildi. Bu işlemle, hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı. Lizis aşamasından sonra buzdolabından çıkartılan slaytlar elektroforez tankında yan yana yerleştirildi. Tank daha önceden hazırlanmış ve pH'ı 13'ten fazla olan elektroforez çözeltisiyle dolduruldu. Tüm slaytların çözeltiyle kaplanmış olması ve hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edildi. Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika bekletildi. Sonrasında DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 24 voltluk elektriksel alanda 30 dakika boyunca yürütüldü. Tüm bu işlemlerin sarı ışıkta yapılmasına özen gösterildi. Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve alkali tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 5 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı.

2.2.f. Boyama

Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama yapılarak Kometler sayıldı. Sayımı o anda yapılamayan slaytlar oda sıcaklığında kurutularak nemli ortamda en fazla bir hafta bekletilebildi. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromür boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 400 büyütmeli floresan mikroskop ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

2.2.g Komet Analizi ve DNA Hasarının Belirlenmesi

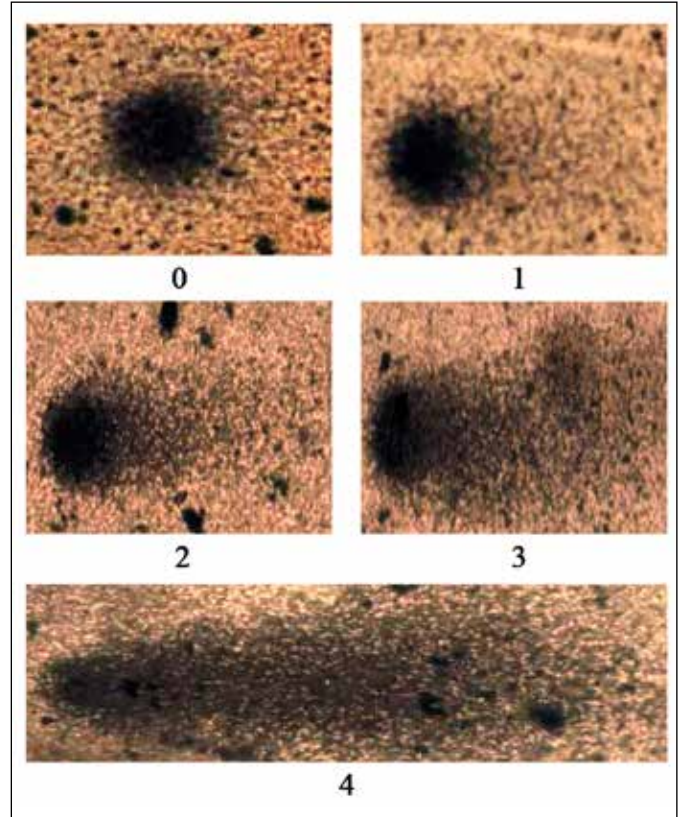
DNA'da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0; çok az hasarlı 1; az hasarlı 2; hasarlı 3; çok hasarlı DNA'lar 4 olarak değerlendirildi (Şekil 2). Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Collins vd. 2004).

2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi Duncan testi kullanılarak yapıldı. EKT'nin ve NaN₃'ün Komet test sisteminde etkilerini belirlemek için SPSS 18,0 analiz programında varyans analizi (ANOVA) uygulandı. EKT'nin konsantrasyonları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem seviyesinde belirlendi.

3. Sonuçlar

İnsan periferel kan lenfositlerine NaN₃ ile birlikte EKT'nin; 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lık konsantrasyonlarını, negatif kontrol olarak saf su ile pozitif kontrol olarak NaN₃'ün uygulanmasından sonra insan periferel kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 1'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, pozitif kontrol olarak kullanılan NaN₃ için, insan periferel kan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu saf suya oranla istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir.



Şekil 2. EKT uygulandığında gözlemlenen Kometler (400x).

* 0: Hasarsız, 1: Çok Az Hasarlı, 2: Az Hasarlı, 3: Hasarlı, 4: Çok Hasarlı.

NaN₃'ün DNA hasarına sebebiyet veren etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, EKT'nin 500 ve 1000 µg/mL'lık dozları dışındaki diğer uygulamalarında konsantrasyona bağımlı olarak belli oranlarda olumlu sonuçların alındığı ve EKT'nin özellikle 250 µg/mL'lık konsantrasyonundaki uygulamalarında en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 1).

4. Tartışma

Ektoinin, değerli bir mikrobiyal ürün olarak görülmesiyle son yıllarda önemli bir Pazar değeri kazanmış ve biyoteknolojik üretimleri yıllık bazda ton düzeyine ulaşmıştır (Becker vd. 2013). EKT'lerin dengeleyici ve koruyucu özellikleri sayesinde farklı alanlarda bol miktarda kullanılmasından dolayı bu çalışmamızda EKT'nin genotoksik potansiyeli KOMET test sistemiyle araştırılmıştır.

EKT'nin, memeli hücrelere uygulandığında hücre membranlarının stabilizasyonunu sağladığı (Harishchandra vd. 2010), insan keratinosit hücrelerini (Buommino vd. 2005) ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı ileum mukozayı koruduğu rapor edilmiştir (Wei vd. 2009). Ayrıca EKT'nin ultraviyole (UV) ışınımını güçlü bir şekilde absorbe ederek DNA'nın parçalanmasını önlediği (Botta vd. 2008), deri iltihaplanmasını hafiflettiği ve Egzema (Atopik Dermatit) rahatsızlığı için kullanılabilmesi bildirilmiştir (Marini vd. 2014).

Araştırmacılar EKT'nin; protein, nükleik asitler ve lipidleri dehidrasyon ve yapısal değişiklikler ile biyolojik aktivite kaybına yol açabilecek stres koşullarına karşı koruduğunu ifade etmişlerdir (Abdel-Aziz vd. 2013). Çalışmamızda, bu görüşü destekler nitelikte, EKT'nin antioksidan özelliği sayesinde oksidatif hasarı engelleyerek lenfosit hücrelerini

stres koşullarına karşı koruduğu gözlemlenmiştir. Farklı bir çalışmada ise, omurgasız bir hayvan olan Su Piresi (*Daphnia magna*)'nde hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından indüklenen oksidatif stresin EKT'nin antioksidan özelliği sayesinde giderildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, aynı çalışmada EKT'nin yüksek konsantrasyonlar da Su piresinin kalp atış hızını düşürdüğü de rapor edilmiştir (Bownik ve Stępniewska 2015a). Benzer bir çalışmalarında ise EKT'nin sığır eritrositlerinde, *Staphylococcus aureus* suşları tarafından üretilen en önemli virülans faktörlerinden Alfa-hemolisin (HlyA)'in hemolitik etkisinden koruyucu etkilere sahip olduğunu belirterek; EKT'nin bu koruyucu özelliğini, HlyA tarafından indüklenen oksidatif stresi azaltmasıyla açıklamışlardır (Bownik ve Stępniewska 2015 b). Araştırmalarımızda NaN₃'ün DNA hasarına neden olduğu gözlemlenmiştir. NaN₃ tarafından teşvik edilen genotoksitenin giderilmesi için uygulanan EKT'nin 500 ve 1000 µg/mL'lık dozları dışındaki uygulamalarında EKT antigenotoksik özellik sergileyerek NaN₃'ün genotoksik etkisini düşürmüştür. Özellikle EKT'nin 250 µg/mL'lık uygulamasından en başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda gözlemlenen antigenotoksik etkinin EKT'nin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. EKT'nin yüksek konsantrasyonlar da genotoksik özellik göstermiş olması bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Araştırmacılar tarafından iki farklı hücre hattı üzerinde (B16-F0 ve A2058) yapılan sitotoksikite çalışmalarında EKT'nin 500 µM'lik konsantrasyonuna kadar olan uygulamalarının sitotoksik olmadığı, 500 µM'in üzerindeki uygulamalarında ise artan doza bağımlı olarak sitotoksitenin arttığı gözlemlenmiştir (Yao vd. 2013).

EKT; biyoteknoloji, kozmetik ve tıp gibi birçok alanda çok fazla kullanılan, yan etkileri olmadığı iddia edilen, farklı

Çizelge 1. EKT uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri.

Sıra No	Uygulama Grupları	Konsantrasyonlar	DNA Hasar Düzeyleri
1.	Kontrol		6.70 ± 0.08 ^a
2.	NaN ₃	5 µM	126.12 ± 0.36 ^e
3.	EKT	100 µg/mL	6.39 ± 0.06 ^a
4.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 10 µg/mL	124.32 ± 0.41 ^{de}
5.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 25 µg/mL	117.20 ± 0.22 ^{de}
6.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 50 µg/mL	106.56 ± 0.17 ^d
7.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 100 µg/mL	98.74 ± 0.27 ^{cd}
8.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 250 µg/mL	65.10 ± 0.29 ^{bc}
9.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 500 µg/mL	131.75 ± 0.09 ^e
10.	NaN ₃ + EKT	5 µM + 1000 µg/mL	138.40 ± 0.05 ^e

*Farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

stres türlerine karşı güçlü bir koruyucu maddedir. Bununla birlikte, izole makromoleküller ve hücre kültürlerinden çeşitli hayvan türlerine kadar, farklı karmaşıklığa ilişkin birçok çalışmayı kapsayan literatürün incelenmesi ve çalışmamızda elde edilen bulguların değerlendirilmesi sonucunda; basit sistemlerde gözlemlenen EKT'nin koruyucu etkisinin daha karmaşık yapılarda başarısız olabileceği düşünülmektedir. Özellikle EKT'nin bazı molekülleri inaktive ettiği (Bownik ve Stepniewska 2016) göz önüne alındığında EKT'nin diğer ilaçlarla olası etkileşimleri nedeniyle kullanımı sınırlı olabilir. Elde edilen bilgiler ışığında EKT'nin etki mekanizmasının detaylı bir şekilde araştırılmasına, farklı kanser hatları üzerinde *in vivo* çalışmalar yapılarak aktivitelerinin incelenmesine ve nanoteknolojik uygulamalarla insanlar üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca EKT'nin hastalık durumlarında kullanılan diğer ilaçlarla olan etkileşimlerinin araştırılması amacıyla *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarının yapılmasıyla, insan sağlığına olası etkilerinin belirlenmesine odaklanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

5. Kaynaklar

- Abdel-Aziz, H., Wadi, W., Abdallah, DM., Lentzen, G., Khayyal, MT. 2013. Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine*, 20: 585-591.
- Arakawa, T., Timasheff, S.N. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.*, 47 (3): 411-414.
- Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, BJ., Borchert, N.S., Stöveken, N., Bremer, E., Wittmann, C. 2013. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microb. Cell Fact.*, 12 (1): 110.
- Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A. S., De Méo, M. 2008. Genotoxicity of visible light (400-800nm) and photoprotection assessment of ectoin, l-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photoch. Photobio. B.*, 91 (1): 24-34.
- Bownik, A., Stepniewska, Z. 2015a. Protective effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* subjected to hydrogen peroxide. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 170: 38-49.
- Bownik, A., Stepniewska, Z. 2015b. Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicon*, 99: 130-135.
- Bownik, A., Stepniewska, Z. 2016. Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arb. Hig. Rada Toksiko.*, 67 (4): 260-264.
- Buommino, E., Schiraldi, C., Baroni, A., Paoletti, I., Lamberti, M., De Rosa, M., Tufano, MA. 2005. Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp 70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperon.*, 10: 197-203.
- Collins, AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.*, 26 (3): 249-261.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol., Toxicol.*, 25: 5-32.
- Göller, K., Galinski, EA. 1999. Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *J. Mol. Catal. B*, 7: 37-45.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., Driller, H. 2008. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. dermatol.*, 26 (4): 326-333.
- Gyori, BM., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., Clement, MV. 2014. Open Comet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox biol.*, 2: 457-465.
- Harishchandra, RK., Wulff, S., Lentzen, G., Neuhaus, T., Galla, HJ. 2010. The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophys. Chem.*, 150: 37-46.
- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., Park, CB. 2005. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS lett.*, 579 (21): 4775-4780.
- Knapp, S., Ladenstein, R., Galinski, EA. 1999. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes b-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*, 3: 191-198.
- Krutmann, J. 2000. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, 23: S22-S26.
- Kurtulmuş, S., Aydın, KA. 2007. Dental döküm alarimlarının genotoksisite, mutajenisite ve karsinojenisitesi. *SÜ Dişhek Fak Derg*, 16: 73-78.
- Marini, A., Reinelt, K., Krutmann, J., Bilstein, A. 2014. Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. *Skin pharmacol. Phys.*, 27 (2): 57-65.
- McArt, DG., McKerr, G., Saetzler, K., Howard, CV., Downes, CS., Wasson, GR. 2010. Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis*, 25 (3): 299-303.
- Moelbert, S., Normand, B., De Los Rios, P. 2004. Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophys. Chem.*, 112 (1): 45-57.

- Nagata, S., Wang, YB. 2001.** Accumulation of ectoine in the halotolerant *Brevibacterium* sp. JCM 6894. *J. Biosci. Bioeng.*, 91 (3): 288-293.
- Pastor, JM., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, LN., Iborra, JL., Vargas C., Nieto, JJ., Cánovas, M. 2010.** Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.*, 28 (6): 782-801.
- Pastor, JM., Bernal, V., Salvador, M., Argandoña, M., Vargas, C., Csonka, L., Sevilla, A., Iborra, JL., Nieto, JJ., Cánovas, M. 2013.** Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.*, 288 (24): 17769-17781.
- Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR., Schneider, EL. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- Strong, PJ., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., Clarke, WP. 2016.** A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresource technol.*, 215: 314-323.
- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J., Unfried, K. 2009.** The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 180: 29-35.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.
- Wei, L., Wedeking, A., Buttner, R., Kalf, J.C., Tolba, R.H., van Echten-Deckert, G. 2009.** A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm in vitro reperfusion injury. *Pathobiology*, 76: 212-220.
- Yao, CL., Lin, Y.M., Mohamed, MS., Chen, JH. 2013.** Inhibitory effect of ectoine on melanogenesis in B16-F0 and A2058 melanoma cell lines. *Biochem. Eng. J.*, 78: 163-169.
- Yu, I., Jindo, Y., Nagaoka, M. 2007.** Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: direct interaction and hydration alteration. *J. Phys. Chem. B*, 111 (34): 10231-10238.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., Wang, Y., Zhu, D., Wang, C., Nagata, S. 2006.** Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J. Biosci. Bioeng.*, 102: 560-563.