



Klor Maruz Kalan A549 Hücre Hattında Çeşitli Antioksidanların Etkileri

Effects of Antioxidants on Chlorine Exposed A549 Cell Line

Sermet Sezigen¹, Meral Sarper²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi KBRN Aabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı; organizmada hipokloridin toksisitesini azaltan antioksidanlar olan berberin, N-Asetil sistein (NAC) ve askorbik asidin A549 hücre hattında hücre ölümü üzerine olan etkilerinin sodyum hipoklorit varlığında in vitro olarak tespit edilmesidir.

Materyal-Metot: Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücre hattı olan A549'un %5 karbon dioksit ile 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde kültürlenerek yayılması ve çoğalması sağlanmıştır. Berberin, NAC ve askorbik asidin etkilerinin incelenmesi amacıyla her bir etken maddenin üç dozu (50µM, 100µM ve 200µM) sodyum hipoklorit (0,5µM) ile muamele edilen A549 hücrelerine uygulanmıştır. İnkübasyon sürecinde hücrelerin yayılması ve çoğalması, hücre sensörü tarafından algılanan empedansın elektronik okuması işlemini gerçekleştiren xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak eş zamanlı olarak izlenmiştir.

Bulgular: xCELLigence kullanılarak yapılan gerçek zamanlı hücre analizinde özellikle yüksek konsantrasyonlardaki (500µM ve 1000µM) sodyum hipokloridin A549 akciğer hücre hattında sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca berberin, NAC ve askorbik asidin sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak hücre ölümünde artışa neden olduğu da gözlemlenmiştir.

Sonuç: Sodyum hipokloridin A549 hücre hattı üzerine olan etkileri gerçek zamanlı olarak görüntülenerek, reaktif oksijen türlerinin toksik dozlarda akciğerler üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Klor maruziyeti sonrasında ortaya çıkan hipokloröz asidin oksidatif etkilerinin, çeşitli antioksidanların kullanılmasıyla azaltıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte çeşitli dozlarda uygulanan berberin, NAC ve askorbik asit gibi antioksidanların sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattında toksik etkileri azaltmadığı sonucuna varılmıştır. Klor maruziyetinde tedavi yaklaşımlarının etkinliklerin karşılaştırıldığı deneysel çalışmalarda bu üç önemli antioksidanın neden olduğu etkilerin mekanizmalarının araştırılmasına ve hücre hasarı azaltacak antioksidan cevabı sağlayabilecek etkin dozun tespit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Klor, Sodyum Hipoklorit, Berberin, Asetilsistein, Askorbik Asit.

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the in vitro apoptotic effects of antioxidants including berberine, N-acetyl cysteine (NAC), and ascorbic acid at different concentrations on A549 cell line with the existence of sodium hypochlorite.

Material-Method: Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line A549 was incubated with 5% CO₂ at 37°C. Three different concentration of berberine, NAC and ascorbic acid (50µM, 100µM, and 200µM) were administered with sodium hypochlorite (0.5µM) to the cell line and the cell line was incubated. Proliferation and attachment quality of exposed cell lines were monitored continuously by using xCELLigence real time cell analysis system which used noninvasive electrical impedance.

Results: Real time cell analysis which was performed by xCELLigence showed that high concentrations of sodium hypochlorite (500µM and 1000µM) had cytotoxic effects on A549 alveolar cell line. Additionally, it was found that high concentrations of berberine, NAC and ascorbic acid caused dose-dependent apoptosis of the cells when they were administered with sodium hypochlorite.

Conclusions: Monitoring apoptotic effects of sodium chloride on A549 cell line with real time analysis showed impacts of reactive oxygen species at toxic doses on lungs. It is known that antioxidants reduce the toxic effects of hypochlorous acid which is seen early after chlorine exposure. However, it is concluded that antioxidants including berberine, NAC, and ascorbic acid could not decrease toxic effects of sodium hypochlorite on A549 cell line. Further experimental studies which could compare effects of treatment approaches in chlorine exposures should be performed in order to investigate the effect mechanisms of these three important antioxidants and to define the necessary essential dose of antioxidant response which could be capable of reducing cellular damage.

Keywords: Chlorine, Sodium Hypochlorite, Berberine, Acetylcysteine, Ascorbic Acid.

Giriş

2013 yılında Suriye’de başlayan iç savaşta başta klor gazı olmak üzere çeşitli toksik kimyasallar sivil hedeflere karşı kullanılmıştır. Endüstriyel kazalar veya terörist saldırılar sonrasında klor gazının canlılar üzerindeki etkilerini ve etki mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek için son zamanlarda reaktif klorit türlerine yönelik birçok çalışma yapılmıştır (1-3). Reaktif bir akciğer irritanı olan klor gazı insan vücuduna özellikle solunum yolu ile alındığında, vücutta klor ve suyun etkileşimi ile hipokloröz asit (HOCl) ve hidroklorik asit (HCl) meydana gelir. HOCl zayıf bir asittir ve çözeltinin pH'ına bağlı olarak hipoklorit iyonu (OCI⁻) ve proton (H⁺) yapısına ayrışır. Genel olarak HOCl’in antiseptik etkisini, OCI⁻ iyonunun ise ortam temizliği verimlilik etkisini belirleyen faktörler olduğu düşünülmektedir (4). Çok sayıda kanıt; ateroskleroz, kronik inflamasyon ve bazı kanser türlerinde aşırı hipokloröz asit/hipoklorit üretiminin söz konusu olabileceğini göstermektedir (5). Ayrıca klor gazına maruziyetin reaktif hava yolu disfonksiyonu sendromuna (RADS) neden olduğu da bilinmektedir (6).

Hüresel seviyede, HOCl’in ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olarak apoptozu veya doğrudan hücre nekrozunu indükleyen sitotoksik bir ajan olduğu gösterilmiştir (5). HOCl veya klor içeren ajanların in vitro ve akciğer dokularındaki akciğer hücrelerine etkileri ile ilgili araştırmalarda; karbonil grupları, 3-klorotirosin ve lipit peroksidasyon ürünlerinin düzeylerinde artış gözlenmiştir. HOCl’in akciğer epitelyal adenokarsinomu A549 hücreleri için mutajenik olduğu gösterilmiştir (5). Ayrıca, nükleotid eksizyon onarımı (NER) bu hücrelerde belirgin bir şekilde inhibe edilmiştir. HOCl’in in vitro A549 hücreleri üzerindeki etkileri; mitokondriyal potansiyel dağılım ve hücre büyümesinin durdurulması ile apoptozisin indüklemesi olarak açıklanmıştır (6). HOCl oluşumuna genellikle reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumu eşlik ettiğinden, bu zararlı oksidanları nötralize eden düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar ve enzimler HOCl’in hüresel etkilerinin sınırlarının belirlenmesinde son derece önemlidir. İnsan akciğerler hücreleri; hücre içi antioksidan savunmasının yanı sıra yüksek seviyelerde glutatyon, askorbik asit, ürik asit ve alfa-tokoferol ile HOCl süpürme kapasitesini gösteren antioksidanları içeren akciğer yüzey aktif madde sistemi tarafından korunmaktadır (6).

Berberin; *Hydrastis canadensis*, *Cortex phellodendri* ve *Rhizoma coptidis* gibi birçok tıbbi aromatik bitkiden izole edilen izokinolin türevi bir alkaloiddir. Geleneksel Çin tıbbında inflamasyon hastalıklarının tedavisinde ve antimikrobiyal olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (7). Son yıllarda berberinin kompleksler oluşturarak DNA ile etkileşim, DNA ve protein sentezi inhibisyonu, hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulması, tümör hücrelerinin çoğalmasının engellenmesini de içeren çok çeşitli farmakolojik etkileri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca berberinin; t-Butil hidroperoksit (t-BHP) kaynaklı karaciğer hasarı modelinde anti-oksidan etkisi olduğu gösterilmiştir (8).

N-Asetil sistein (NAC); L-sistein ve indirgenmiş glutatyon (GSH) öncüsü olan bir tiyol ve mukolitik ajandır. Antioksidan ve SH bağlama özelliklerinin doğrudan bir sonucu olarak,

NAC hüresel redoks durumunu geri dönüştürür ve bu şekilde Nükleer Faktör-kB (NF-kB) gibi redoks duyarlı hücre sinyal ve transkripsiyon yollarının aktivitesi ile birlikte çeşitli proinflamatuvar genleri düzenler (9).

HOCl’in etkilerini azaltan bir diğer önemli antioksidan ise askorbik asittir. Askorbik asit; halojenürlerin, özellikle klor oksidasyonunu katalize etmek için hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanan miyeloperoksidazın etkisiyle uyarılmış fagositik hücreler tarafından üretilir. Ayrıca yüksek dozlarda hücreleri apoptoza yönlendirir. Askorbik asidin bu amaçla çeşitli antikanser maddelerle kombine halde kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (10).

Bu çalışmanın amacı; organizmada hipokloridin toksisitesini azalttığı belirlenen antioksidanların, hücre ölüm mekanizması üzerine etkili olduğu gösterilen yüksek dozlardaki etkilerinin sodyum hipoklorit varlığında in vitro olarak tespit edilmesidir. Bu amaçla klor gazına solunum yolu ile maruziyette ilk temas noktası olan akciğer dokusu temel alınarak A549 hücre hattı kullanılmış ve klor kaynağı olarak kullanılan sodyum hipokloride maruz bırakılmış hücrelerde yüksek dozdaki antioksidanların sitotoksosite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Etkilerin zamana bağlı daha sağlıklı incelenmesi amacıyla çalışmamız gerçek zamanlı sitotoksosite analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Materyal-Metot

Hücrelerin Üretilmesi

Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücre hattı olan A549 (ATCC®, Manassas, VA) %10’luk fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin ve streptomisin ilavesiyle takviye edilmiş Dulbecco’nun modifiye Eagle ortamında (DMEM; Life Technologies, Grand Island, NY) kültürlenmiştir. Tüm hücre kültürleri karbondioksit inkübatöründe %5 CO₂ lik nemli bir atmosferde 37°C sıcaklıkta tutulmuştur.

Gerçek Zamanlı Sitotoksosite Analizi

A549 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin ve streptomisin ile DMEM ortamında tutulmuştur. Hücreler %5 CO₂ ile 37°C sıcaklıkta inkübatörde kültürlenmiştir. Hücrelerin yayılma ve çoğalması; hücre sensörü tarafından algılanan empedansın elektronik okuması ile xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (ACEA Biosciences, San Diego, CA) kullanılarak sürekli olarak izlenmiştir. Her bir zaman noktasında; hücrelerle birlikte kuyucuğun hücre elektrot empedansı (Rt) ve kuyucuğun arka plan empedansı (Rb) kullanılarak Hücre İndeksi (CI) değerleri hesaplanmıştır. Normalize Edilmiş Hücre İndeksi (NEHI); hücrelerin kuyucuklara ilk ekilmesinden sonra hücrelerin çoğalarak istenen sayıya ulaştığı ve analiz edilecek numunelerin eklendiği 22. saat 56. dakikadaki CI değerinin, ilgi anındaki CI değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır (11).

Sodyum hipokloridin A549 hücre hattı üzerinde doza bağımlı toksik etkilerinin ölçümü için, 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 2.500-5.000 hücre ekilmiştir. 22 saat 56 dakika sonra sodyum hipoklorit dozları (0,5µM, 5µM, 10µM, 100µM, 500µM ve 1000µM) seri olarak seyreltilerek hücrelerin bulunduğu kuyucuklara eklenmiş ve etkiler 72 saat

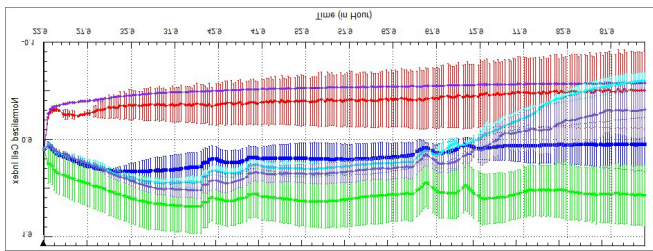
boyunca gözlenmiştir. Hücre-elektrot empedansı, zamana bağlı hücre tepkisi dinamik eğrilerini üretmek için her 15 dakikada bir xCELLigence sistemi kullanılarak izlenmiştir. Berberin; NAC ve askorbik asidin etkilerinin incelenmesi amacıyla her bir etken maddenin üç dozu seçilmiştir. Uygulanacak etken madde dozları seçilirken daha önce yapılan çalışmalar temel olarak alınmış ve bu çalışmada etken maddelerin sitotoksik etki göstermediği en yüksek dozlar olan 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M çalışmamızda uygulama dozları olarak seçilmiştir (8, 10, 12). Bu üç etken maddenin farklı dozlarının sodyum hipoklorit (0,5 μ M) ile 72 saat muamele edilmiş hücreler üzerinde etkilerinin incelenmesi amacıyla yine her bir kuyucuğa olacak şekilde 2.500-5.000 A549 hücresi ekilmiştir. 22. saat 56. dakikada 0,5 μ M sodyum hipoklorit ile etken maddelerin farklı dozları kuyucuklara eklenmiş ve hücreler inkübasyona bırakılmıştır.

İstatistiksel Analiz

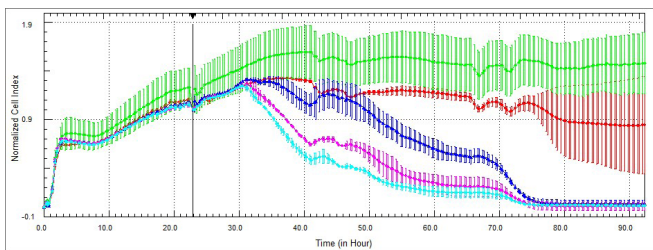
Farklı doz antioksidanların etkileri GraphPad yazılımı (GraphPad, San Diego, CA) kullanılarak Student's t testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular

xCELLigence kullanılarak yapılan gerçek zamanlı hücre analizinde özellikle yüksek konsantrasyonlardaki (500 μ M ve 1000 μ M) sodyum hipokloridin sitotoksik olduğu ve hızla A549 hücrelerini öldürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 1). 500 μ M sodyum hipoklorit uygulandıktan sonra ilk saat içerisinde Normalize Edilmiş Hücre İndeksi 0.9'dan 0.6'ya düşmüş ve 10. saat sonunda 0.5'e düşmüş ve daha sonra bu seviyede kalmıştır. 1000 μ M sodyum hipoklorit uygulanması sonrasında Normalize Edilmiş Hücre İndeksi 1. saatte hızlı bir düşüş göstermiş ve 20. saat sonunda Normalize Edilmiş Hücre İndeksi 0.4 değerinde sabit bir hal almıştır.



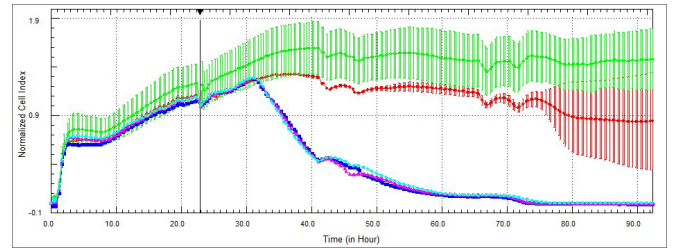
Şekil 1. Sodyum hipokloridin A549 hücre hattı üzerine etkileri doza bağımlı etkisi (• Kontrol, • 0.5 μ M, • 5 μ M, • 10 μ M, • 100 μ M, • 500 μ M ve • 1000 μ M)



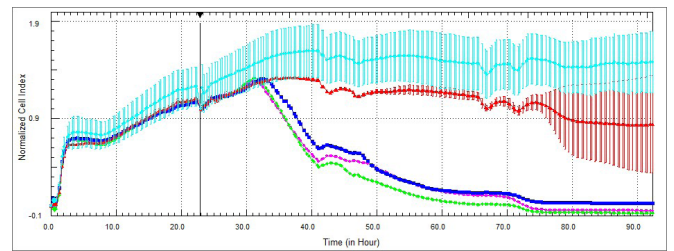
Şekil 2. Sodyum hipoklorit varlığında berberinin A549 hücre hattı üzerine etkileri (• Kontrol, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+50 μ M Berberin, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+100 μ M Berberin • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+200 μ M Berberin)

Berberinin sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattı üzerine etkileri incelendiğinde doza bağımlı olarak hücre ölümünde bir artış gözlenmiştir (Şekil 2). Tüm uygulamalarda ilk 8 saatte sitotoksik etki gözlenmezken 8. saat sonunda farklı doz berberin ve sodyum hipoklorit uygulamalarında Normalize Edilmiş Hücre İndeksi düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş en yüksek dozda en fazla iken en düşük dozda en az olarak tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Uygulamanın 50. saatinde ise tüm berberin ve sodyum hipoklorit kombinasyonu uygulamalarında Normalize Edilmiş Hücre İndeksi -0.2'ye düşmüş ve bu süreden sonra değer sabit bir hal almıştır.

Yüksek antioksidan özellikleri bilinen NAC'ın sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattı üzerine etkileri incelendiğinde Normalize Edilmiş Hücre İndeksinin tüm uygulamalarda ilk 8 saatte sitotoksik etki gözlenmezken 8. saat sonunda tüm NAC ve sodyum hipoklorit kombinasyonu uygulamalarında hızlı bir düşüş gözlenmiş ve uygulamanın 50. Saatinde Normalize Edilmiş Hücre İndeksi 1.4'ten 0.2'ye düşmüştür. Tüm NAC dozlarında Normalize Edilmiş Hücre İndeksi profilleri benzer bulunmuştur ($p > 0,05$) (Şekil 3).



Şekil 3. Sodyum hipoklorit varlığında NAC'ın A549 hücre hattı üzerine etkileri (• Kontrol, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+50 μ M NAC, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+100 μ M NAC • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+200 μ M NAC)



Şekil 4. Sodyum hipoklorit varlığında askorbik asidin A549 hücre hattı üzerine etkileri (• Kontrol, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+50 μ M Askorbik Asit, • 0.5 μ M Sodyum Hipoklorit+100 μ M Askorbik asit)

Askorbik asidin sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattı üzerine etkileri incelendiğinde ise Normalize Edilmiş Hücre İndeksinin tüm uygulamalarda ilk 8 saatte sitotoksik etki gözlenmezken 8. saat sonunda askorbik asit ve sodyum hipoklorit kombinasyonu uygulamalarında hızlı bir düşüş gözlenmiş ve uygulamanın 16. Saatinde bu düşüş yavaşlamıştır. 50. Saat sonunda Normalize Edilmiş Hücre İndeksi 1.4'ten 0.2'ye düşmüştür (Şekil 4).

Tartışma

Oksidan ajanların hücre homeostazını bozduğu ve oksidatif stresin hücre yaşlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (13). Yüksek oksidasyon potansiyeli (1,49 V) olan hipokloröz asit/hipokloridin hücrelerde oksidatif strese yola açtığı ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (14-15). Her ne kadar kloraminlerin hipokloröz asit/hipokloridin proteinler ve amino asitlerle tepkimesi sonucu oluştuğu bildirilmiş olsa bile bu maddelerin hücrelerdeki veya kültürdeki hücreler üzerindeki doğrudan etkileri hakkındaki yeterli bilgi mevcut değildir. Robaszkiewicz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sodyum hipokloridin A549 hücrelerin %25'ini öldürdüğü konsantrasyon $564,9 \pm 87 \mu\text{M}$ olarak tespit edilmiştir (13). Bir maddenin sitotoksik etki göstermesinden bahsedilebilmesi için söz konusu maddenin belirtilen dozda belirtilen hücre tipindeki hücrelerin en az %50'sini öldürmesi gerekmektedir (14). Kullanılan düşük doz sodyum hipoklorit konsantrasyonları (0,5 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM) A549 hücre hattında başlangıç hücre sayısının %50'sini öldürememiştir. Robaszkiewicz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yüksek doz klorik asit etkilerinin antioksidanlar tarafından tersine çevrilmesi gösterilmiştir (6). Ancak düşük doz klorik asit ile yüksek doz antioksidan uygulamasının etkileri üzerine bir çalışma rastlanmamıştır. Birçok antioksidanın yüksek uygulama dozlarında antikanser etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle söz konusu yüksek antioksidan dozların sitotoksik etki gözlenmeyen sodyum hipoklorit dozlarında nasıl etki gösterdiği araştırılmıştır. Bu nedenle belirtilen sodyum hipoklorit konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Sodyum hipokloridin bu dozlarda A549 hücre hattı üzerine etkisi doza bağımlı olarak artmıştır. Sodyum hipoklorit ideal dezenfektan olarak birçok gereksinimi yerine getirmektedir. Sodyum hipokloridin temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinde etkinliği, mevcut klor konsantrasyonuna ve çözeltinin pH'ına bağlıdır. Bu nedenle elde ettiğimiz sonuç literatür ile uyumludur (13).

Antioksidanlar, radikal işlemlerin engelleyicileri olarak işlev görür. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinin azaltılmasında sıklıkla kullanılırlar. Genellikle antioksidanların birincil etkisi ön planda tutulmakla birlikte bu bileşiklerin minimal düzeyde oksidan etkileri mevcuttur (15). Oksitleyicilerin hücre homeostazisini bozduğu ve oksidatif stresin hücre yaşlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (16). Çalışmamızda, gerçek zamanlı sitotoksikite testi ile sodyum hipokloridin büyüme ortamındaki A549 hücrelerine eklendiğinde hücre canlılığını azalttığını gösterilmiştir. Hipokloridin yanı sıra antioksidanların apoptozu tetiklediği ve aynı zamanda oksidasyonu azalttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (17, 18). Doza ve hücre yapısına bağlı olan gelişen bu etkilerin; hipokloridlerin etkilerini ne şekilde değiştireceğini tespit etmeyi amaçlayan çalışmamızda kullanılan A549 hücre hattında, tüm antioksidan maddeler çeşitli konsantrasyonlarda ve sodyum hipoklorit varlığında hücre ölüm oranını artırmıştır.

Berberin; mantar, maya ve bakteri proliferasyonunu inhibe ederek geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumu sergiler. Çalışmalar berberinin çeşitli in vivo ve in vitro modellerde

antikanser, ve antiproliferatif etkiler gösterdiğini göstermiştir (8). Bununla birlikte sodyum hipoklorit varlığında berberin doza bağımlı olarak hücre ölümünü artırmıştır. NAC reaktif oksijen türlerinin sayısız biyolojik ve patolojik süreçteki rolünü araştırmak için kullanılmıştır. NAC; c-Jun N-terminal kinazın, p38 MAP kinazın, redoks-duyarlı aktifleştirici protein-1'in ve çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen NF-kB transkripsiyon faktörün aktivasyonunu inhibe eder (19). Yapılan çalışmalarda NAC'ın hücre ölümü üzerine farklı etkileri saptanmıştır. Bir kısım araştırmacılar NAC'ın hücre ölümünü engellediği sonucuna varırken bazı çalışmalarda ise NAC'ın hücre ölümünü artırdığı tespit edilmiştir (20, 21). Bizim bulgularımız NAC'ın sodyum hipoklorit varlığında doza bağımlı olarak hücre ölümünü artırdığını desteklemektedir. Askorbik asidin ve klasik antikanser ajanları olarak bilinmeyen bir dizi başka maddenin serbest radikal üretimi ile ilişkili gibi görünen bir miktar antineoplastik aktivitesi mevcuttur. Bununla birlikte deneysel olarak; MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, K3 vitamini ile takviye edilen yüksek C vitamini konsantrasyonlarına karşı in vitro hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir (22). Çalışmamızda sodyum hipoklorit varlığında askorbik asidin hücre ölümü üzerindeki etkisinin doza bağımlı olarak değiştiği değerlendirilmiştir.

Sonuç

Tüm bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda; sodyum hipokloridin A549 hücre hattı üzerine olan etkileri gerçek zamanlı olarak görüntülenerek reaktif oksijen türlerinin toksik dozlarda akciğer üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda bile berberin, NAC ve askorbik asit gibi antioksidanların sodyum hipoklorit varlığında A549 hücre hattında toksik etkileri azaltmadığı sonucuna varılmıştır. Sonraki çalışmalar ile bu etkileri gerçekleştiren mekanizmalar ile klorun neden olduğu hücre hasarı azaltacak antioksidan cevabı sağlayabilecek etkin dozun tespit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Jirásek V, Lukes P. Formation of reactive chlorine species in saline solution treated by non-equilibrium atmospheric pressure He/O₂ plasma jet. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2019; 28(3), doi: 10.1088/1361-6595/ab0930.
2. Cabezas CE, Briones AC, Aguirre C, Pardo-Esté C, Castro-Severyn J, Salinas CR et al. The transcription factor SlyA from *Salmonella Typhimurium* regulates genes in response to hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *Res Microbiol.* 2018; 169(6): 263-78.
3. Severing AL, Rembe JD, Koester V, Stuermer EK. Safety and efficacy profiles of different commercial sodium hypochlorite/hypochlorous acid solutions (NaClO/HClO): antimicrobial efficacy, cytotoxic impact and physicochemical parameters in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 74(2): 365-72.
4. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science.* 2006; 11(4): 147-57.

5. Güngör N, Knaapen AM, Munnia A, Peluso M, Haenen GR, Chiu RK et al. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 2009; 25(2): 149-54.
6. Robaszekiewicz A, Pogorzelska M, Bartosz G, Soszyński. Chloric acid (I) affects antioxidant defense of lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 2011; 25(7): 1328-34.
7. Ivanovska N, Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int J Immunopharmacol*, 1996; 18(10): 553-61.
8. Peng PL, Hsieh YS, Wang CJ, Hsu JL, Chou FP. Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006; 214(1): 8-15.
9. Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007; 20(1): 9-22.
10. Vissers MC, Lee WG, Hampton MB. Regulation of apoptosis by vitamin C. specific antioxidant protection against exposure to chlorinated oxidants. *J Biol Chem*, 2001; 276(59): 46835-40.
11. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Bio*, 2011; 740: 33-43.
12. Atkins KB, Lodhi IJ, Hurley LL, Hinshaw. N-acetylcysteine and endothelial cell injury by sulfur mustard. *J Appl Toxicol*, 2000; 20(S1): S125-S8.
13. Robaszekiewicz A, Bartosz G, Soszyński M. N-Chloroamino acids mediate the action of hypochlorite on A549 lung cancer cells in culture. *Toxicology*, 2010; 270(2-3): 112-20.
14. Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm*, 2002; 232(1): 183-92.
15. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*, 1991; 91(3): 2S-13S.
16. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2004; 117(11): 2417-26.
17. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 2002; 7(9): 405-10.
18. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003; 189(1-2): 41-54.
19. Zafarullah M, Li W, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60(1): 6-20.
20. Tsai J-C, Jain M, Hsieh C-M, Lee W-S, Yoshizumi M, Patterson C, et al. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1996; 271(7): 3667-70.
21. Nargi JL, Ratan RR, Griffin DE. p53-independent inhibition of proliferation and p21Waf1/Cip1-modulated induction of cell death by the antioxidants N-acetylcysteine and vitamin E. *Neoplasia*, 1999; 1(6): 544-56.
22. Kurbacher CM, Wagner U, Kolster B, Andreotti PE, Krebs D, Bruckner HW. Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett*, 1996; 103(2): 183-9.