

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AROMATİK AMİN İLAÇLARIN REAKTİF METABOLİTLERİNİN
PROTEİNLERDE OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI, *MENTHA*
LONGIFOLIA BİTKİSİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Veysel GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR

Eylül 2014

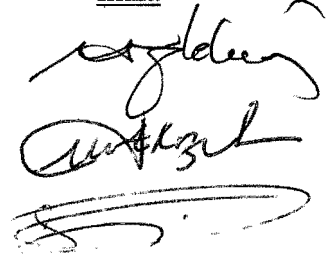
T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Veysel GÜZEL tarafından yapılan “Aromatik Amin İlaçların Reaktif Metabolitlerinin Proteinlerde Oluşturduğu Hasara Karşı, *Mentha longifolia* Bitkisinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Çetin AYTEKİN
Üye : Prof. Dr. Murat KIZIL (Danışman)
Üye : Prof. Dr. Fikret UYAR

İmza



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 24/09/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../2014

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmalarım sırasında sınırsız desteği ile her türlü bilgi birikiminden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında güler yüzü ve pozitif enerjisi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince hem deneysel hemde teorik bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Bircan ÇEKEN, Sevil EMEN ve Sevcan ALTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım ayrıca tez çalışmam sırasında her türlü destekte bulunan sevgili arkadaşım Hayrettin DİNÇ'e teşekkür ederim.

Laboratuvarımıza teknik desteklerinden dolayı İhsan ZEYREK ve Askeri YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Bu çalışmaya laboratuvar imkânı sağlayıp Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Fen Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP 14-FF-26 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde bana duydukları güven ve sonsuz desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme özellikle babam Yusuf GÜZEL, annem Harbiye GÜZEL'e, kardeşlerime ve bu süreçte yanımda olan tüm dostlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
RESİM LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
KISALTMA ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonları	1
1.2. İlaçların İstenmeyen Reaksiyonları	1
1.2.1. Aplastik Anemi	6
1.2.2. Agranülositoz	6
1.2.3. Trombositopeni	7
1.3. Deri Veremi	7
1.4. İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonlarının Olası Mekanizmaları	10
1.4.1. İmmün-Aracılı İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonu	10
1.4.1.1. Hapten Hipotezi	10
1.4.1.2. Danger Hipotezi	12
1.4.1.3. Farmakolojik Etkileşim Hipotezi	14
1.4.2. İmmün-Aracılı Olmayan İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonu veya Metabolit İdyosenkrazi	16
1.5. Reaktif Metabolitlerin Rolü	16
1.6. Reaktif Metabolit Türleri	17
1.6.1. İyi Ayrılan Gruplar	17
1.6.2. Halka Gerginliği	18
1.6.3. Michael Akseptörü	18
1.6.4. Elektron Çeken Gruplar	19
1.6.5. Serbest Radikaller	19
1.7. Faz II Reaksiyonları	20
1.7.1. Glukuronik Asitle Konjugasyon (Glukuronidasyon)	20
1.7.2. Sülfat Konjugasyonu (Sülfatasyon)	22
1.8. Karbon Merkezli Radikaller	22
1.9. Diazonyum Tuzlarının Oluşumu ve Bozulması	26
1.10. Uçucu Yağlar	28
1.10.1. Uçucu Yağların Biyolojik Etkileri	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ	33
3. MATERYAL ve METOT	45
3.1.1. Kullanılan Bitki Türü, Yayılışı ve Kullanım Alanları	45
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.1.3. Kullanılan Aletler	46
3.2.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	47
3.2.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini	48
3.2.3. Diazonyum Tuzlarının Hazırlanması	49
3.2.4. 4-Kloro-2-Nitro Tetrafloroborat Sentezi	50
3.2.5. Prokainamid Tetrafloroborat Sentezi	50
3.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	51
3.3.1.1. Agaroz Jel'in Hazırlanması	51
3.3.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi Yapılması	52
3.3.1.3. Plazmid Saflaştırma	52

3.3.1.4.	Tens Yöntemi	53
3.3.1.5.	Mini Prep	53
3.4.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)	53
3.4.1.	Bant Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması	54
3.5.	Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	54
3.5.1.	Uçucu Yağ Eldesi	55
3.5.2.	Stok Diazonyum Tuzu Çözeltisinin Hazırlanması	55
3.5.3.	Stok Elektron Donör Çözeltisinin Hazırlanması	55
3.5.4.	Stok Uçucu Yağ Çözeltisinin Hazırlanması	55
3.5.5.	Stok Bitki Ekstraktı Çözeltisinin Hazırlanması	55
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1.	Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	57
4.2.	Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini	58
4.3.	4-Kloro-2-Nitro Tetrafloroborat Sentezi	59
4.4.	Prokainamid Tetrafloroborat Sentezi	59
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	99
6.	KAYNAKLAR	117
	ÖZGEÇMİŞ	126

ÖZET

AROMATİK AMİN İLAÇLARIN REAKTİF METABOLİTLERİNİN PROTEİNLERDE OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI, *MENTHA LONGIFOLIA* BİTKİSİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veysel GÜZEL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2014

Aromatik amin içeren ilaçların insanlarda aril radikallerine dönüştüğü, daha sonra bu radikallerin myeloperoksidaz (MPO)/H₂O₂ metabolizması aracılığıyla bir protein radikali oluşturduğunu ve bu durumun da yan etki olarak agranülositosis (nötrofil azalması) denilen hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid, ameliyat sonrası hastalarda ya da kardiyak aritmilerin uzun süreli bakım tedavilerinde kullanılan bir ilaçtır. Aromatik amin içeren ilaçların kullanımı sırasında agranülositosis hastalığı meydana gelmektedir.

Bu tez çalışmasında, prokainamid ilacının diazonyum tuzunun meydana getirdiği aril radikallerinin, *Mentha longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağı ile söndürme etkisi araştırıldı. Bu amaçla karbon merkezli aril radikali oluşturup, DNA kesimine neden olduğu bilinen 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat model olarak seçildi. Ayrıca prokainamid tetrafloroborat tuzu hazırlandı. 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ve prokainamid tetrafloroborat tuzlarından oluşan aril radikallerinin, protein ve DNA'da meydana getirdiği hasarı önlemeye karşı *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisi çalışıldı.

Serbest-radikal söndürücüler veya temel antioksidantlar olarak davranan bileşiklerin başlıca gruplarından biri olarak bitki fenolikleri oldukça önemli yer tutmaktadır. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının incelenen toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktarının yüksek olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının, protein ve DNA'da oksidatif hasara neden olan karbon merkezli aril radikallerinin etkisini azalttığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Prokainamid, Diazonyum Tuzu, *Mentha longifolia subsp. typhoides var. typhoides*, Oksidatif DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu, Agranülositoz, Aril Radikali

ABSTRACT

THE PROTECTIVE EFFECT OF *MENTHA LONGIFOLIA* AGAINST REACTIVE METABOLITES THAT DAMAGE PROTEINS DERIVED FROM AROMATIC AMINES

MSc. THESIS

Veysel GÜZEL

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2014

Aromatic amine-containing drugs in humans is converted to aryl radicals, then these radicals through the metabolism of myeloperoxidase (MPO) / H_2O_2 forms a protein radical. This condition as a side effect associated with the disease called agranulocytosis (decrease of neutrophils). Procainamide is a drug used in treatment of antiarrhythmics. This drug is used for the treatment in patients after surgery or long-term care of cardiac arrhythmias. The use of aromatic amine-containing drugs by patients cause agranulocytosis disease.

In this thesis, we have investigated the scavenging effect of methanol extract and essential oils of *Mentha longifolia* on the diazonium salt of the drug procainamide induced aryl radicals.

For this purpose, 4-chloro-2-nitro tetrafluoroborate was chosen as a model to produce carbon centered aryl radical. This radical known to cause DNA strand breaks. Procainamide tetrafluoroborate salt was also prepared. The protective effect of methanol extract and essential oil of *M. longifolia* was evaluated against the damage effect of aryl radical which are generated from 4-chloro-2-nitro tetrafluoroborate and procainamide tetrafluoroborate on both protein and DNA.

The plant phenolics are major groups of extremely important free-radical compounds that act as antioxidants. The total amount of phenolic and flavonoid compounds were found to be high in the methanol extract and essential oils of *M. longifolia*.

In conclusion, the results indicate that the potency of the carbon- centered aryl radicals to cause DNA strand breaks and oxidative protein damage were attenuated by methanol extract and essential oils of *M. longifolia*.

Keywords: Procainamide, *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*, Oxidative DNA Damage, Protein Oxidation, Agranulocytosis, Aryl Radical

FOTOĞRAF LİSTESİ

<u>Fotoğraf No</u>		<u>Sayfa No</u>
Fotoğraf 4.1.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	61
Fotoğraf 4.2.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	63
Fotoğraf 4.3.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	65
Fotoğraf 4.4.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi	67
Fotoğraf 4.5.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	69
Fotoğraf 4.6.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	71
Fotoğraf 4.7.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif Bovine serum albumin (BSA) hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	73
Fotoğraf 4.8.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	74
Fotoğraf 4.9.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-	75

Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi

- Fotoğraf 4.10.** *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu BSA hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **76**
- Fotoğraf 4.11.** *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **77**
- Fotoğraf 4.12.** *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **78**
- Fotoğraf 4.13.** pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ile kesim reaksiyonunun etanol ve β -merkapt etanol varlığında koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **79**
- Fotoğraf 4.14.** Bovine serum albumin (BSA)'nın, bakır (I) klorür ve 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β -merkapt etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **81**
- Fotoğraf 4.15.** Bovine serum albumin (BSA)'nın, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β -merkapt etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **82**
- Fotoğraf 4.16.** *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **83**
- Fotoğraf 4.17.** *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **85**
- Fotoğraf 4.18.** *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi **87**

Fotoğraf 4.19.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), prokainamid tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	89
Fotoğraf 4.20.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif BSA hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	91
Fotoğraf 4.21.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	92
Fotoğraf 4.22.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif BSA hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	93
Fotoğraf 4.23.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), prokainamid tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	94
Fotoğraf 4.24.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve prokainamid tetrafloroborat ile kesim reaksiyonunun etanol ve β -merkapt etanol varlığında Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	95
Fotoğraf 4.25.	Bovine serum albumin (BSA)'nın, bakır (I) klorür ve prokainamid tetrafloroborat kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β -merkapt etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	97
Fotoğraf 4.26.	Bovine serum albumin (BSA)'nın, prokainamid tetrafloroborat kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β -merkapt etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi	98

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1.	Hapten hipotezi	11
Şekil 1.2.	Danger hipotezi	13
Şekil 1.3.	Farmakolojik etkileşim hipotezi	15
Şekil 1.4.	İyi ayrılan gruplara örnekler	17
Şekil 1.5.	Metilsülfonat iyi bir ayrılan gruptur	18
Şekil 1.6.	Mekloreタミン, yeniden düzenlenmeye maruz kalarak gergin aziridinium iyonunun oluşumuna yol açar ve bu da nükleofil ile reaksiyona girer	18
Şekil 1.7.	Akrolein ile glutatyonun Michaels reaksiyonu	18
Şekil 1.8.	N-asetil sulfametoksazolün sülfamid grubunun elektron çekme etkisi ile nitrenyum iyonu oluşumunun engellenmesi	19
Şekil 1.9.	Siklopropil amin halka açılmasının serbet radikal oluşum mekanizması	19
Şekil 1.10.	Reaktif bir açıl glukuronid olan diklofenak'ın biyoaktivasyonu	21
Şekil 1.11.	Reaktif O-sülfat için antifungal bileşik NDPS'in biyoaktivasyonu	22
Şekil 1.12.	Metilhidrazinin oksidasyonu üzerinden metil radikali oluşumu	23
Şekil 1.13.	Fenelzinin oksidasyonu ile karbon merkezli 2-feniletıl radikali oluşumu	24
Şekil 1.14.	Bir diazene ürününden oluşan distamisin-bağlı trimetilenmetanın foto-oluşumu	24
Şekil 1.15.	Sentetik enediyenlerin yapıları ve önerilen mekanizmaları: 1-siklodekanenediyne diol, 2-propagirik sülfon, 3-allenfosfoprin oksit	25
Şekil 1.16.	4-alkinil-3-metoksi-4-hidroksisiklobutanondan oluşan diradikallerin DNA-kesiminin oluşumu	25
Şekil 1.17.	Diazolama mekanizması	26
Şekil 1.18.	Triazenler ve alkanediazoatelerin asit katalizli ayrışmaları	26

Şekil 1.19.	Diazonyum tuzlarının heterolitik ve homolitik formlarının oluşumu	27
Şekil 1.20.	DNA baz ürünleri	27
Şekil 1.21.	DNA parçasındaki şeker ve baz kısımları üzerinde hidrojen işaretleme	28
Şekil 1.22.	Bir kekik türünde elektron mikroskopunda görülen ve salgı tüylerinin ucunda bulunan uçucu yağ keseleri (salgı cepleri)	29
Şekil 2.1.	Agaritinin biyoaktivasyon yolu	34
Şekil 2.2.	Karbon merkezli radikallerin söndürülmesi	34
Şekil 2.3.	1,4-Diradikalleri oluşumu	34
Şekil 2.4.	Sentezlenen süstitüe triarilamidler	36
Şekil 2.5.	Aminoglutethimid'in biyoaktivasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin inhibisyonu	37
Şekil 2.6.	Prokainamid'in biyoaktivasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin inhibisyonu	38
Şekil 2.7.	Vücutta oluşan fenil radikallerin, GSH ve çoklu doymamış yağ asitleri tarafında söndürme reaksiyonu	39
Şekil 2.8.	DPPH· ve monoterpenerler arasındaki olası reaksiyon mekanizması	40
Şekil 3.1.	Gallik asit	47
Şekil 3.2.	Quercetin	48
Şekil 3.3.	Diazonyum tuzlarının sentezi	49
Şekil 3.4.	Plazmid DNA'nın formları	52
Şekil 5.1.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin uçucu yağ bileşenleri	101
Şekil 5.2.	<i>Rosmarinus</i> bitkisinin uçucu yağ bileşenleri	101
Şekil 5.3.	Deoksiriboz şekerinden 1', 4' ve 5" hidrojen atomları	105
Şekil 5.4.	4" Hidrojen atomu koparılması	105
Şekil 5.5.	Hidrokarbon otooksidasyonunun ve antioksidant korumanın mekanizması	110

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarı	57
Tablo 4.2.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarı	58
Tablo 4.3.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi	62
Tablo 4.4.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	64
Tablo 4.5.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	66
Tablo 4.6.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi	68
Tablo 4.7.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	70
Tablo 4.8.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	72
Tablo 4.9.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ile etanol ve β -merkaptto etanolün etkisinin incelenmesi	80
Tablo 4.10.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi	84
Tablo 4.11.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	86
Tablo 4.12.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi	88
Tablo 4.13.	<i>M. longifolia</i> bitkisinin Uçucu Yağının (UY), prokainamid tetrafloroborat varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi	90
Tablo 4.14.	pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve prokainamid tetrafloroborat ile etanol ve β -merkaptto etanolün etkisinin incelenmesi	96

KISALTMALAR

AAPH	: 2'-azobis(2-aminidopropan)hidroklorür
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DMF	: N,N-Dimetil formamid
DMPO	: 5,5-dimetilprolin-N-oksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPR	: Elektron Spin yakalama
ESR	: Elektron spin rezonans
GSH	: Glutasyon
HRP	: Yabanturbu peroksidaz enzimi
İİR	: İdiyosinkratik ilaç reaksiyonları
LA	: Lineoleik asit
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MNP	: 2-metil-2-nitrosopropan
MPO	: Myeloperoksidaz
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PUFAs	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	: Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

1.1. İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonları

İdiyosinkratik istenmeyen ilaç reaksiyonları (İİR) insanlarda, ilaç geliştirme çalışmaları sırasında aşınmaya maruz kalan klinik olarak anlamlı toksisite, geniş bir neden olabilir. Mekanizma ve risk faktörleri ilaç ve hastanın her ikisinden de kaynaklanabilir. Ana ilaç veya metabolitlerinden kaynaklanan bileşiğin düzenlenmesi ve/veya immün aktivasyonu ile ilgili etkiler, organel toksisitesi gibi birden çok katkıda bulunan mekanizmalar içerebilir. Ciddi bir sağlık problemi olmakla birlikte ilaç geliştirme çalışmaları için de büyük sorun teşkil eder. Elde edilen bulguların, bu durumlardan ilaçların reaktif metabolitlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir.

İİR terimi her insan için farklı anlam ifade eder, ilacın bilinen farmakolojik toksik profili ile açıklanamayan ve karakteristik özellikleri taşımayan reaksiyonlardır.

1.2. İlaçların İstenmeyen Reaksiyonları

Dünya Sağlık Örgütü ilaçların istenmeyen reaksiyonlarını, zararlı ve hastalıklardan korunmak için insanlarda kullanılan normal dozda bile meydana gelen, teşhis, hastalığın tedavisi veya fizyolojik fonksiyonların modifikasyonunda, ilaca verilen cevap olarak tanımlar. Hastaların %2-6 da meydana gelir (Bates ve ark. 1995, Classen ve ark. 1997) ve Kuzey Amerika'da meydana gelen ölümlerin en önemli nedenlerindedir (Lazarou ve ark. 1998). İlaçların istenmeyen reaksiyonları nedenlerine ve şiddetlerine göre 6 gruba ayrılabilirler.

- A. Artan farmakolojik etki
- B. Tuhaf etkiler (idiyosinkratik olarak ifade edilebilir)
- C. Kronik etkiler
- D. Gecikmiş etkiler
- E. Tedavi sonu etkileri
- F. Tedavinin başarısızlığı

1. GİRİŞ

İlaçların istenmeyen reaksiyonları arasından bazıları, maruziyet arttığından dolayı (A), ilacın farmakolojik etkisinin artışına neden olur. Bundan dolayı, onlar tahmin edilebilir ve önlenir. Bazıları ise tuhaf etkiler gibi, ilacın bilinen farmakolojik özelliklerinden (B) dolayı tahmin edilemeyebilir. İlaçların istenmeyen reaksiyonlarının yaklaşık %80'ne A reaksiyonları neden olurken, kalan %20 de B reaksiyonları neden olur. Ancak, tahmin edilemeyen mekanizmaları nedeniyle, önemli derecede sağlık problemi teşkil eder (Jick 1984, Patterson 1984).

İİR olarak bilinen B reaksiyonları, klinik olarak kullanılan doz aralığı içinde, çoğu hastada meydana gelmez (Utrecht 2007a) ve ilacın bilinen farmakolojisini içermeyen bu reaksiyonlar, İİR olarak bilinir. Herhangi bir organ üzerinde etkili olabilirler, fakat yaygın olarak karaciğer, deri ve kemik iliği üzerinde etkilidirler. İİR'nin belirtileri, hafif deri döküntüsü ile daha ciddi olarak hayatı tehdit eden durumlar arasında değişebilir.

Çoğu İİR'nin mekanizması hala bilinmemektedir. Çoğunun immün-aracılı olduğu (Utrecht 2009) ve bir ilacın reaktif metabolitlerinin, çoğu ilaç-kaynaklı İİR de merkezi rol oynadığı şüphelenilmektedir (Utrecht 1990, Park ve ark. 1992, Utrecht 1992). Biyoaktivasyon olarak bilinen, bir ilacın reaktif metabolitleri, ilacın hem faz I hem de faz II metabolik yollarından oluşabilir. Faz I reaksiyonları, moleküle hidroksil, karboksil, amino asit veya tiyol gibi polar fonksiyonel gruplar takmak yada var olan bir fonksiyonel grubu değiştirmektir. Dolayısıyla molekül daha polar hale gelir ve atılımı kolaylaşır. Konjugasyon reaksiyonları olarak bilinen faz II, glukronik asit, sülfat, asetat, amid ve glutatyon katılma ürünleri gibi polar iyonize olabilen grupların enzimatik olarak katıldığı bir anlamda sentez reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan konjugatlar genellikle faz I reaksiyonu sonucu moleküle kazandırılmış fonksiyonel gruplar üzerinden yürür ve sonuç olarak suda çözünen aktive olmuş ve toksisitesini kaybetmiş ürünler oluşur.

Reaktif metabolitler, ya yükseltgenme ya da nadiren indirgenme suretiyle oluşurlar. Bunların oluşumuna genellikle sitokrom P450 enzimleri, flavin monooksijenazlar (FMOs), monoamin oksidazlar (MAOs) ve heme-içeren peroksidazlar aracılık eder (örneğin siklooksijenaz (COX) ve myeloperoksidaz (MPO)) (Tafazoli ve O'Brien 2005). Buna ek olarak biyoaktivasyon konjugatif yollar ile

oluşabilir (örneğin sülfasyon ve glukuronasyon) (Kalgutkar ve Soglia 2005). Bazı durumlarda, bir reaktif metabolitin oluşumu birden fazla enzimatik ve/veya kimyasal adımlarda oluşacağı gibi, tek bir enzimatik reaksiyonda biyoaktivasyona neden olabilir.

Biyoaktivasyon sonucu meydana gelen reaktif metabolitler sitotoksisite, hücresel oksidatif stres (Tafazoli ve ark. 2005), veya genotoksisitede direkt toksik etkilere neden olabilirler. DNA'ya kovalent bağlandıkları zaman ise mutasyonlara veya karsinogenesisiteye neden olurlar (Fieser 1938, Miller 1947). Ayrıca reaktif metabolitler diğer makromoleküllerde kovalent bağlanabilir. Örneğin, proteinlere kovalent bağlanarak hücresel hasara neden olurlar (Ikehata ve ark. 2008).

İlaçlara bağlı gelişen toksik olaylar, karaciğer hasarının en sık sebeplerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Bunun nedeni karaciğerin birçok ilaç veya kimyasal ajanın metabolizması için temel organ olmasıdır. Toksik etkinin daha iyi anlaşılabilmesi için kısaca ilaçların normal metabolizmasına bakmak gerekir. Kullanılan ilaçların birçoğunun emilimlerinin kolay olması için lipofilik yapıya sahip olmaları gerekir. Biyotransformasyon ile hidrofilik özellik kazandıktan sonra idrar veya safra ile vücuttan atılabilir hale gelirler (faz I ve faz II reaksiyonları). Karaciğer, sitokrom P450 olarak adlandırılan, metabolizmada ana rol oynayan heme gurubuna sahip bir protein enzimi içerir. Ancak bazı durumlarda, ilaç veya diğer ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu reaktif ara ürünler oluşur. Çoğu reaktif ara ürünlerin yüksek reaktivite ve kısa biyolojik yarı ömründen dolayı, karaciğerde oluşan reaktif metabolitler atılamayabilir ve diğer dokulara ulaşarak istenmeyen reaksiyonlara neden olabilirler. Buyüzden, karaciğer İİR için temel hedeftir (Tarazi ve ark. 1993 Zimmerman1993).

900'den fazla ilaç ve toksinlerin karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir. İlaça bağlı karaciğer hasarı şiddetli ve geri dönüşümsüz olarak karaciğer yetmezliğine neden olabilir. Klinik olarak bu durumun, akut veya kronik olarak iki tip belirtisi vardır. Akut karaciğer hasarı, sitotoksik veya kolestatik olarak karşımıza çıkabilir. Kronik karaciğer hasarı ise, kronik hepatit, yağlanma, fosfolipidozis, granümatöz hastalığı, vasküler lezyonların çeşitli formları, siroz ve çeşitli karaciğer tümörleri içerebilir (Zimmerman 1993).

1. GİRİŞ

İlaça bağılı karaciğer hasarı moleküler mekanizmalarına göre iki katagoriye ayrılır. İlacın veya metabolitlerinin doğrudan toksisiteye neden olduğu ve karaciğere karşı bir ilaç tetikleyici immün cevap oluştuğundan dolayı karaciğer hasarı oluşur. Bu olaylara sırasıyla gerçek hepatotoksinler ve idiyosinkratik hepatotoksinler denir. Gerçek hepatotoksinlere karbon tetraklorür, asetaminofen, ve alkol örnekleri verilebilirken, idiyosinkratik hepatotoksinlere ise halotan, tienelik asit, fenitoin, fenobarbital, ve troglitazon örnekleri verilebilir (Beaune ve Lecoer 1997)

İİR'nin etkili olduğu (Svensson 2009), vücudun en büyük organı olan ve biyotransformasyonda rol alan çeşitli enzimlere sahip diğer bir organ ise deridir. Sitokrom P450, flavin monooksijenazlar, glutation-S-transferaz, N-asetiltransferazlar ve sulfotransferazların, sentezlerinin deride olduğu bilinmektedir (Svensson 2009); ancak, bu enzimlerin çoğunun konsantrasyonu karaciğerdeki konsantrasyonlarından daha düşüktür. Bu enzimler, ilaçları biyoaktivasyonları sonucu reaktif metabolitlerine dönüştürürler (Pannatier ve ark. 1978, Mukhtar ve Khan 1989) ve bu metabolitler proteinlere kovalent bağlanarak deri döküntüsüne neden olurlar. İlaç kaynaklı deri reaksiyonları hastaların %2-3 de etkilidir (Bigby ve ark. 1986). İlaçların istenmeyen reaksiyonları sonucu oluşan deri reaksiyonlarının çoğu şiddetli olmamakla birlikte bazıları ölümcüldür.

İlaçların çoğu bir ölçüde istenmeyen deri reaksiyonlarına neden olur, ancak yaygın olarak kullanılan bazı ilaçların deri döküntüsü üzerine oldukça yüksek etkileri vardır. Trimetoprim-sulfametoksazol ve diğer sulfonamid antibiyotikleri kısa süreli kullanılan ilaçlara, karbamazepin, nevirapine ve fenorbital ise uzun süreli kullanılan ilaçlara örnek verilebilir (Roujeau ve ark. 1995).

Şiddetli deri reaksiyonlarının çoğu idiyosinkratiktir ve immün-aracılı olduğu düşünülmektedir. Derideki bazı hücreler, langerhans hücreleri ve dendritik hücreleri gibi, reaksiyonun başlamasını sağlar ve spesifik T hücrelerine antijen sunar (Stingl ve ark. 1981). Bu şiddetli deri döküntüsüne CD8+ T hücrelerinin aracılık ettiği düşünülmektedir (Blanca 2008). Bu tür hastaların epidermisinde CD8+ hücrelerinin olduğu gözlemlenmiştir (Hertl ve Merk 1995).

İİR'in diğeri bir hedefi kan hücreleri veya kemik iliğidir. İnsan kanı, normal vücut ağırlığının %7-8'ni oluşturmaktadır. Kan hücrelerinin taşınmasında rol alan ve kan hacminin %55'ni oluşturan plazma içerisinde üç çeşit kan hücresi bulunmaktadır. Bunlar kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri veya lökositler ve trombositler olarak bilinmektedir.

Kırmızı kan hücreleri ve eritrositlerin temel fonksiyonu, oksijen ve karbondioksit taşımaktır. Bunlar kompleks bir madde olan hemoglobini ihtiva eden hücrelerdir. Hemoglobin akciğerlerdeki oksijeni, kan dolaşımı yoluyla ince kan damarlarına taşımak üzere bağlar ve kan dolaşımından ona ihtiyaç duyan hücrelere gitmek üzere serbest bırakır. Beyaz kan hücreleri ve lökositler, vücudun mikroplara ve zararlı etkenlere karşı savunmasında görev alırlar. Lökositlerin bir çeşidi olan granülosit, kendi içerisinde nötrofil, eozinofil ve bazofil olmak üzere üç bileşene sahiptir. Granülositler granül içerdikleri için bu ismi almıştır. Bu granüller hücre çeşitlerine göre farklı kimyasallar içerir. Trombositlerin temel fonksiyonu ise kan pıhtılaşmasının oluşumunda görev alır.

Kan hücreleri veya kemik iliğinde, şiddetli derecede istenmeyen ilaç reaksiyonları meydana gelebilir. Eğer kan hücrelerinin tümü tükenmiş ise (lökosit, eritrosit ve trombosit), aplastik anemi olarak bilinen durum ortaya çıkar. Buda çok yüksek ölüm oranları taşır. Selektif olarak bazı kan hücrelerinin tükenmesiyle çeşitli durumlar ortaya çıkar. Kırmızı kan hücrelerinin tükenmesiyle hemolitik anemi, bu tükenme alyuvar öncülerini içeriyorsa saf kırmızı hücre aplazisi olarak adlandırılır. Trombositlerin azalmasıyla trombositopeni durumu ortaya çıkar. Granülositler tükendiği zaman, agranülositoz oluşur. Bu hücreler bol miktarda nötrofil olmak üzere eozinofil ve bazofil içerir. Eğer sadece nötrofiller tükenirse, nötropeni durumu ortaya çıkar. Buda yüksek ölüm oranıyla ilişkilidir. Çünkü bu tür hücresi olmayan bir hasta, antibiyotikler ile kontrol edilemeyen çok yüksek enfeksiyon riski taşır (Utrecht 1990).

1.2.1. Aplastik Anemi

Kemik iliğinde bulunan elementlerin tümü tükendiği zaman aplastik anemi durumu ortaya çıkar. Aplastik anemi' den kaynaklı ölüm oranı, agranülositoz'dan çok daha yüksek olmakla birlikte iyileşme süresi de daha uzundur. Aplastik anemi durumunda, özellikle granülositler ve trombositler olmak üzere vücuttaki üç bileşenden en az ikisi etkilenir (Rothman ve Amorosi 1979). İlaça bağlı aplastik anemi, ilaca bağlı agranülositoz' dan daha az yaygın görülür. Fakat İİR'in bu iki türüne neden olan ilaçlar arasında önemli bir örtüşme vardır. Bu ilaçların çoğu, enzim myeloperoksidazları tarafından biyoaktive edilir (Utrecht 1990). Agranülositoz çoğunlukla ilaç kaynaklı oluşurken, aplastik anemi ise genellikle idyopatiktir. Nedeni tam olarak bilinmesede viral olduğu düşünülmektedir (Young ve Alter 1994). İlaç kaynaklı veya idyopatik olup olmadığı, immunosüpresyon cevap verdiği için aplastik anemi immün aracılığı olduğu görülmektedir (Scheinberg ve ark. 2008).

1.2.2. Agranülositoz

İİR'nin en önemlilerinden biri agranülositozdur. Yapısında bulunan granüller tükendiği zaman bu durum ortaya çıkar. Nötrofillerin normal sayısı 5000-10,000 hücre/ μ L dir. Oysaki, agranülositoz olduğu durumda, bu sayı 500 hücre/ μ L'den daha az olur. İlaç kaynaklı agranülositoz genellikle geri dönüşümlüdür ve ilaç kullanmayı bıraktıktan yaklaşık 1 hafta sonra nötrofil sayısı normale döner veya normalin üzerine çıkar. Bu zaman aralığında agranülositoz ciddi bir enfeksiyon kasılmasına neden olur ve bazı durumlarda ciddi enfeksiyon riskinin artması, nötrofillerin geri kazanılmasını geciktirir. İlaç kaynaklı agranülositozun neden olduğu ölüm oranı yaklaşık %10'dur. Bu oran, semptomların erken tanınması (yaygın olarak boğaz ağrısı ve ateş) ve sorumlu ilaç kullanımının kesilmesi ile azaltılabilir.

Aminopirin gibi ilaçların neden olduğu agranülositoz olan bazı hastalarda, nötrofillere karşı antikolar bulunabilir (Moeschlin ve Wagner 1952). Bunun yanısıra propiltiyourasil-kaynaklı agranülositoz olan bazı hastalarda granülositler, monositler ve hematopoetik öncü hücreleri ile tepkimeye giren antikolar bulunmuştur (Fibbe ve ark. 1986). Bazı hastalarda ise, myeloperoksidaz ve diğer antijenlere karşı antinötrofik

sitoplazmik antikorlar bulunduğu ve bu antikorların, nötrofil yıkımında önemli etkileri olduğu görülmüştür (Akamizu ve ark. 2002).

Mevcut kullanımda olan klozapin, idiyosinkratik agranülositozun yüksek insidansı ile ilişkilidir. Bu ilaç, nötrofillerin myeloperoksidaz sistemi tarafından reaktif nitrenyum iyon metabolitine okside edilir ve nötrofillere kovalent bağlanmasına yol açar (Gardner ve ark. 1998a). Klozapin kaynaklı agranülositoz olan hastalarda ilk belirtiler şiddetli olmayabilir. İkinci defa bu hastalığa yakalanan hastalarda yaklaşık 6 haftalık bir süreçte hastalığın şiddeti artar (Safferman ve ark. 1992, Marchesi ve ark. 2005). Bu durumun immün aracılı bir reaksiyon olduğu öne sürülmez (Guest ve ark. 1998).

1.2.3. Trombositopeni

Trombositlerin tükenmesi sonucu ortaya çıkar. Heparin ve kinin gibi ilaçlar trombositopeniye neden olan ilaçlara örnek verilebilir. Warkentin ve ark (2003) tarafından yapılan çalışmada heparin den dolayı oluşan trombositopeni durumunda, heparin-trombosit kompleksine karşı antikorlar gözlemlendiği ve bu durumun da açıkça immün aracılı bir reaksiyon olduğu gösterilmiştir. Heparin kaynaklı trombositopeninin geçmişine bakıldığında, bir hastanın bu ilacı yeniden kullanmasıyla genellikle trombositopeni oluşturmaz. Bu da immün hafızanın yokluğunu ifade eder (Warkentin ve Kelton 2001). Kinin den dolayı oluşan trombositopeni durumunda ise, ilaçtan ziyade trombosit membran glikoproteinler üzerindeki spesifik epitoplara karşı antikorlar üretilir. Bunun nedeni ise ilacın bağlanmasıyla glikoproteinin konformasyon yapısında bir değişikliğe neden olduğundan dolayı olabilir (Aster 1999).

1.3. Deri Veremi

Sistemik lupus eritematoz, (SLE- derinin kızarması), veya basit lupus, birçok farklı endojen antijenlere antikor üretebilen bir otoimmün hastalıktır (örneğin, hastaların kendi dokularına karşı antikor üretmesi gibi). Antikorlar nükleer antijenlere bağlanarak lupusu teşhis etmek için yaygın olarak kullanılırlar. Buyüzden antinükleer antikorlar olarak bilinirler. Lupusun yaygın belirtileri ateş, kansızlık, eklem ağrıları, ve karakteristik deri döküntüsüdür. B-lenfositlerinin poliklonal aktivasyonu veya T-

1. GİRİŞ

lenfositlerinin bozulmuş fonksiyonunun lupus oluşumuna neden olduğu ileri sürülmüştür (Utrecht 1988). İlaç kaynaklı lupus ve idyopatik lupus olmak üzere iki tür etmen lupus oluşumunu tetikleyebilir.

Lupus'un oluşum nedeni bilinmediği zaman idyopatik lupus, ilaçlar tarafından benzer otoimmün sendromuna neden oluyorsa, ilaç kaynaklı lupus olarak bilinir. Lupus oluşumunun yaklaşık %10'u ilaç kaynaklıdır. Prokainamid ve hidralazin gibi ilaçlar, ilaç kaynaklı lupusun yüksek insidansı ile ilişkili ilaçlar arasındadır (Utrecht ve Woosley 1981). Fakat bu ilaçların kullanımı azalmıştır. Şu anda, birçok ilaç, minosiklin, izoniazid ve karbamazepin gibi, ilaç kaynaklı lupus oluşumuna neden olmaktadır (Woosley ve ark. 1978). İmmün cevapları değiştirebilen lupus-benzeri sendroma neden olan biyolojik ajanlar bulunmuştur. Her ne kadar antinükleer antikorlar çok daha erken saptanabilsede, bu sendrom klinik olarak belirgin hale gelmeden önce sorumlu ilaç ile tedavisi 1 yıldan fazla sürer (Woosley ve ark. 1978). Antinükleer antikorların varlığı teşhis için çok önemlidir. Daha yakın zamanlarda, ilaç kaynaklı lupus olan hastaların, myeloperoksidaz için spesifik olan antinötrofilik sitoplazmik antikorlara sahip olduğu keşfedilmiştir (Choi ve ark. 1998, Merkel 1998). İlaç kaynaklı lupus ile ilişkili olan ilaçların çoğu, aynı zamanda myeloperoksidaz tarafından reaktif metabolitlerine oksitlenir (Utrecht 2005). Buyüzden, ilaç kaynaklı lupus için olası mekanizmalardan bir tanesi, makrofajlar tarafından veya myeloperoksidaza bağlanan bir reaktif metabolitin oluşumuna yol açan diğer antijen sağlayan hücreler tarafından ve makrofajları aktive eden bir ilacın oksidasyonudur (Utrecht 1990). Penisilamin, otoimmün sendromlara yol açarak makrofajlara bağlanan ve onları aktive eden önemli bir ilaçtır. İlaç kaynaklı lupus için önerilen diğer bir mekanizma ise, DNA metilasyonunun inhibisyonudur (Richardson 2003).

Aşağıdaki tabloda, hepatotoksisitenin nispeten yüksek insidansı ile ilişkili olan ve reaktif metabolitlerin oluşup oluşmadığı bilinen ilaçların listesi verilmiştir (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. Reaktif metabolitleri olduğu bilinen bazı ilaçlar için hematolojik toksisitenin insidansı

İlaç	Toksisite	İnsidans (%)	Reaktif Metabolit
Amodiaquine	Agranülositoz	%0,05	Evet
Clozapine	Agranülositoz	%0,8%-1	Evet
Hydralazine	Sistemik lupus eritematoz	%1-21	Evet
Remoxipride	Aplastik anemi	%0,002	Evet
Captopril	Nötropeni	%0,012	Evet
Procainamide	Sistemik lupus eritematoz	%5-10	Evet
Ticlopidine	Agranülositoz	%1-2	Evet
Vesnarinone	Agranülositoz	%1-2	Evet

1.4. İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonlarının Olası Mekanizmaları

1.4.1. İmmün-Aracılı İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonu

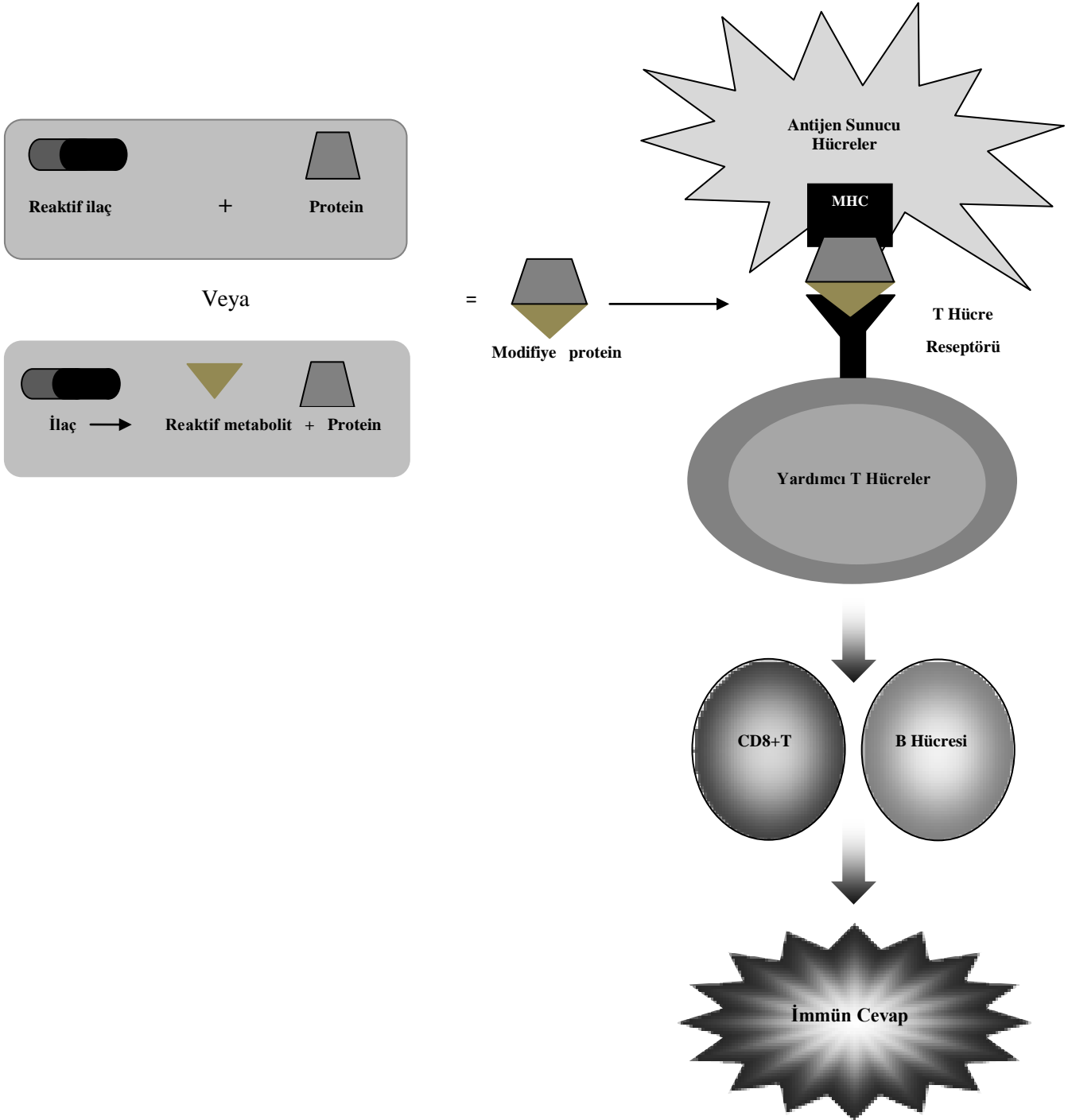
İmmün-aracılı idiyosinkratik ilaç reaksiyonlarının mekanizmalarını açıklamak için mevcut olan üç ana hipotez vardır (Utrecht 2007a).

1. Hapten hipotezi
2. Danger hipotezi
3. Farmakolojik etkileşim hipotezi

1.4.1.1. Hapten Hipotezi

Landsteiner 1935’de, düşük moleküler kütleyle sahip organik moleküller ile yapmış olduğu bir dizi deneyde, proteine bağlanmayan ve kimyasal olarak reaktif olmayan küçük moleküllerin immün cevap oluşturmadığını rapor etmiştir. Bu durum, küçük moleküllerin (<1000 dalton) kendilerinin immünojenik olmadığını belirten hapten hipotezi önerisine yol açmıştır. Bu moleküller proteinlere geri dönüşümsüz olarak bağlanırlarsa yapısı değişmiş protein bir immün yanıtı neden olabilir (Şekil 1.1.). Proteine bağlanarak immün yanıt oluşturan küçük moleküller, hapten olarak adlandırılır.

Genel olarak, bir immün yanıt oluşturmak için, reaktif ilaç veya reaktif metaboliti tarafından oluşturulan yapısı değiştirilmiş protein, antijen sunan hücreler tarafından alınır ve yardımcı T hücreleri tarafından tanınması için MHC molekülüne verilir. Bu durumda sinyal 1 oluşur. Sinyal 1, T hücresi aracılığıyla immün yanıt oluşumunu tetiklemek için gereklidir.



Şekil 1.1. Hapten hipotezi (Utrecht 2007a)

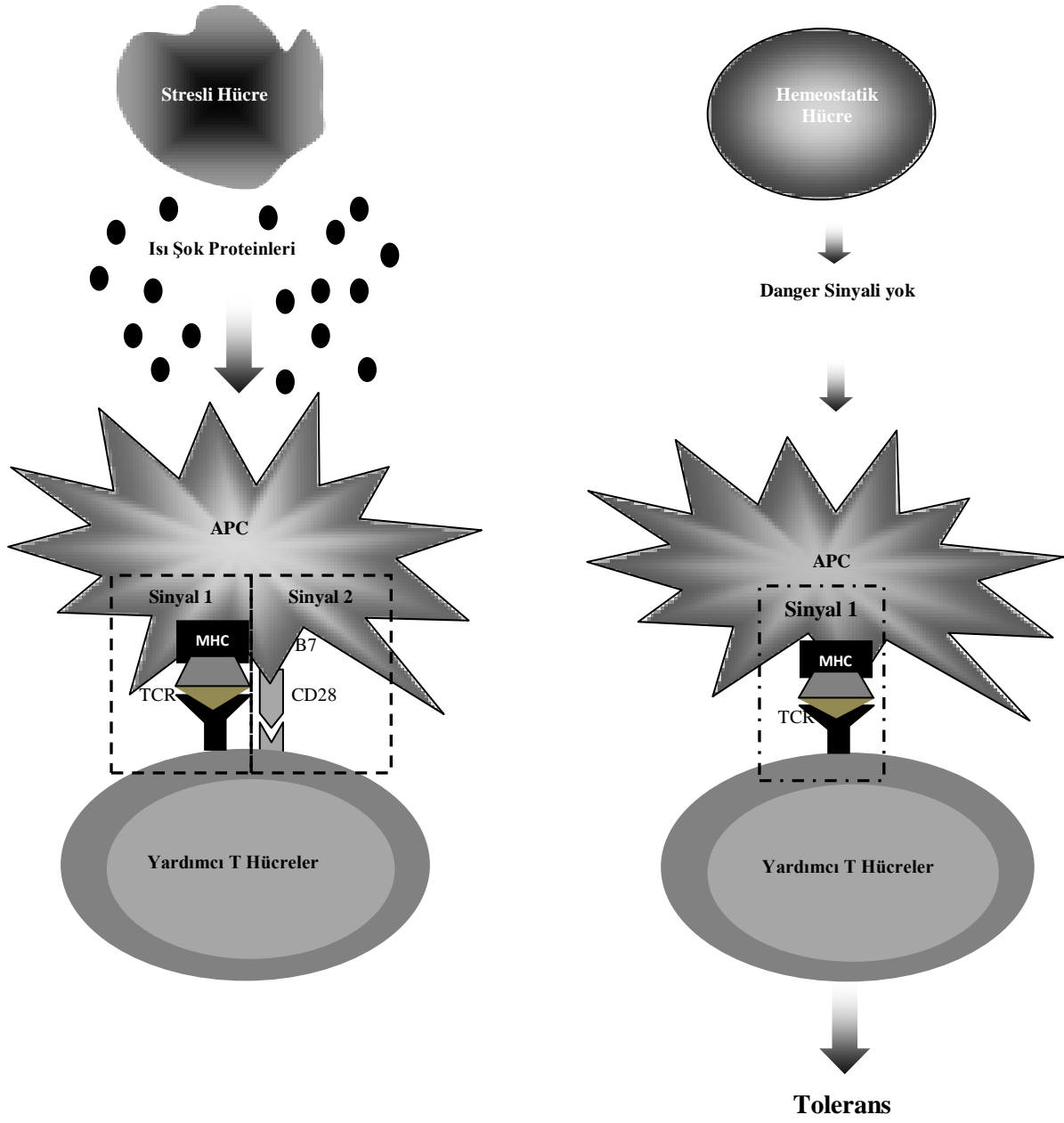
Penisilin kaynaklı anafilaksi, haptten hipotezine uyan ve immün yanıt oluşturan iyi bir örnektir (Parker ve ark. 1962). Reaktif metabolit oluşturarak haptten olarak hareket eden, halotan kaynaklı hepatotoksisite (Vergani ve ark. 1980), Aminopirin kaynaklı agranülositoz (Moeschlin ve Wagner 1952) ve tienilik asit kaynaklı hepatotoksisite (Lecoeur ve ark. 1996) örnekleri çoğaltılabilir.

1.4.1.2. Danger Hipotezi

Danger hipotezinin öncülerinden olan Polly Matzinger, organizma tehlike veya stresin bazı türlerine bağlı olmadıkça, organizmanın immün sistemi kendinden olmayan proteinlere yanıt vermeyeceğini öne sürmüştür (Matzinger 1994). Antijen sunan hücreler üzerindeki B7'ler gibi, uyarıcı moleküller tarafından düzenlenebilen stresli hücrelerde, danger sinyali oluşur ve uyarılmış T hücreleri ile etkileşime girer. (CD28 ile B7 etkileşimleri). Bu etkileşim sinyal 2 olarak adlandırılır. Sinyal 2, immün cevaba yol açar, T hücrelerinin aktive edilmesinde kritik rol oynar ve sinyal 2' nin yokluğunda, varsayılan yanıt immün toleranstır. İmmün tolerans, genellikle danger sinyali olmayan, hücreler apoptoza uğradıkları zaman gözlemlenmektedir (Şekil 1.2.).

Hücre stresinin kaynağı, cerrahi ve enfeksiyon gibi bir çok etkeni içerebilir. Ayrıca, reaktif metaboliti proteine kovalent bağlanarak, ilaç kaynaklı da olabilir (Seguin ve Utrecht 2003). Bazen doğuştan gelen immün sisteme ait hücreler, makrofajlar, NK hücreleri ve T hücreleri danger sinyalini tetikleyen sitokinleri serbest bırakabilir (Utrecht 1999).

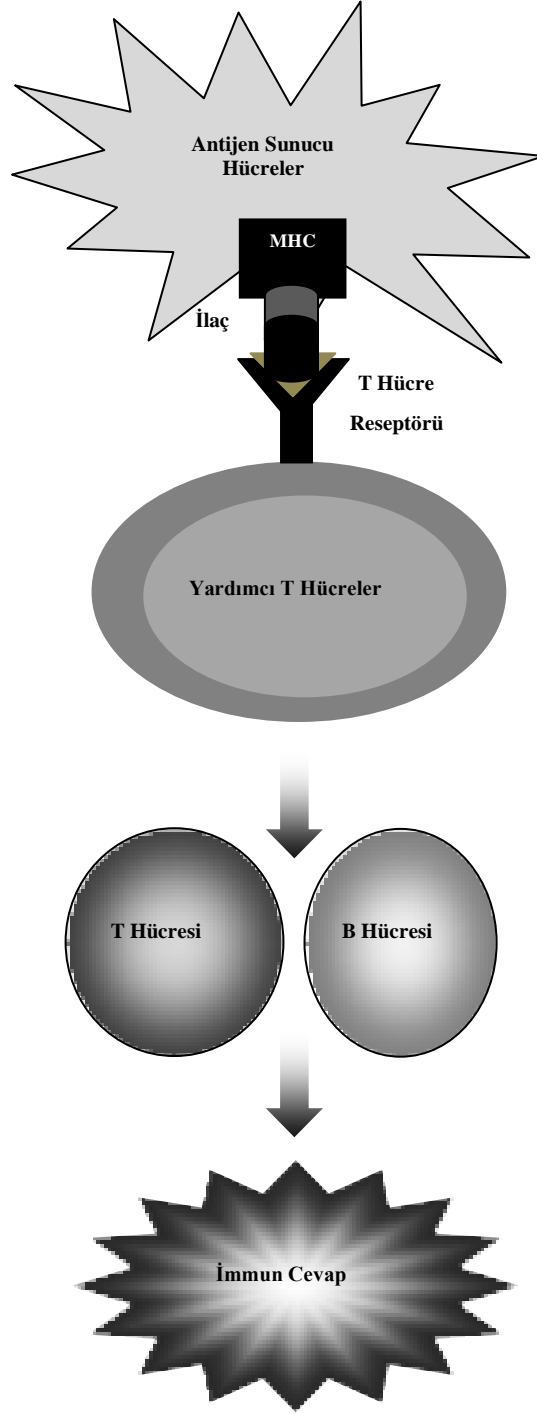
Danger sinyallerinin Seong ve Matzinger tarafından, hipo olarak bilinen hidrofobik biyolojik moleküllerin de dahil olduğu bir dizi molekülden meydana geldiği önerilmiştir (Seong ve Matzinger 2004). Bunlara stres proteinleri olarak bilinen ısı şok proteinleri ve HMGB1 örnek verilebilir (Harris ve Raucchi 2006).



Şekil 1.2. Danger hipotezi (Utrecht, 2007a)

1.4.1.3. Farmakolojik Etkileşim Hipotezi

Farmakolojik etkileşim hipotezi olarak adlandırılan bu kavram Werner Pichler tarafından önerilmiştir (Pichler 2002). Pichler, metabolizmanın yokluğunda, sülfametoksazol cevap olarak, sülfametoksazol proliferatif ile tedavi edildiğinde, idiyosinkratik ilaç reaksiyonuna sahip olduğu bilinen hastada T-hücreleri kolonileri olduğunu saptamıştır. Bu gözleme dayanarak, ana ilaç doğrudan antijen olarak hareket edebilir ve g e i d ö n ü ş ü m l ü olarak MHC ile daha sonra T-hücresinin aktivasyonuna neden olan T-hücre reseptör kompleksine bağlanabilir ve immün cevap oluşumunu tetikler. İlaç ve immün hücre arasındaki etkileşim, bir reseptör ile ilacın farmakolojik etkileşiminin kovalent olmayan analogudur. Pichler bu durumu farmakolojik etkileşim hipotezi olarak adlandırmıştır. Bu hipotez ayrıca, reaktif metabolitlerin, immün cevabın oluşması için gerekli olmadığını ifade ediyor (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Farmakolojik etkileşim hipotezi (Utrecht, 2007a)

1.4.2. İmmün-Aracılı Olmayan İdiyosinkratik İlaç Reaksiyonu veya Metabolit İdyosenkrazi

İİR çoğu İmmün aracılı olsa da, immün aracılı olmayan İİR'da araştırmalar sonucu gözlemlenmiştir. Eğer İİR immün aracılı değil ve karaciğeri içeriyorsa, metabolik idyosenkrazi olarak adlandırılır. Ateş veya döküntünün olmaması ve ilacın verilmesinden hemen sonra bu belirtilerin başlamaması metabolik idyosenkrazisi özellikleri arasındadır. Bu duruma, troglitazon kaynaklı karaciğer yetmezliği (Smith 2003) ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olan valproat bağlı hepatotoksisite (Bryant ve Dreifuss 1996, Tang ve Abbott 1996) örnek verilebilir.

1.5. Reaktif Metabolitlerin Rolü

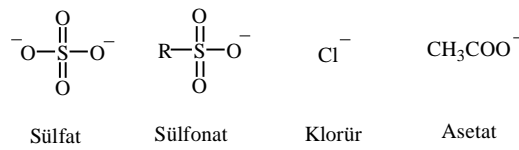
İlaç metabolizmasının temel ilkesi, lipofilik ilaç veya ksenobiyotikleri, daha kolay bir şekilde vücuttan atılabilen hidrofilik metabolitlere dönüştürmektir. Bazen biyotransformasyon sırasında ilaç yada ksenobiyotiklerin bazıları, reaktif metabolit olarak bilinen kimyasal reaktif türleri aktive edebilir. Reaktif metabolitler genellikle elektronca fakir moleküllerdir ve elektrofil olarak adlandırılırlar. Eğer bunlar uygun bir şekilde zehirsizleştirilmezse, bu elektrofiller kovalent bağ oluşumu üzerinden nükleofil olarak bilinen elektronca zengin türler ile reaksiyona girer. Nükleofiller genellikle elektrofiller ile yeni bir bağ oluşturabilen, yalnız bir elektron çiftine sahip S, N veya O gibi atomları içerir. Bu tür nükleofiller, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerde mevcuttur. Reaktif metabolitlerin İİRs ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kimyasal reaktif metabolitler doğrudan proteinler ile reaksiyona girerek, protein yapısında veya katlanmasında değişikliklere neden olur (Utrecht 2007b). Bu yapısı değişmiş protein, antijen sağlayan hücreler tarafından işleme tabi tutulur ve immün sistem tarafından yabancı olarak görülüp, bir immün cevaba yol açar. Kimyasal reaktif elektrofiller DNA üzerindeki nükleik asitler ile kovalent bağlanarak, DNA yapısı veya gen dizisinde değişikliğe neden olur. DNA'da ki bu değişiklikler kanserojeniteye veya teratojeniteye yol açabilir (Nelson 1982, Pirmohamed ve ark. 1994).

1.6. Reaktif Metabolit Türleri

Yukarıda belirtildiği gibi, reaktif metabolitler genellikle elektrofiller veya serbest radikallerdir. Elektrofiller, yumuşak veya sert elektrofil olarak ayrılabilirler. Yumuşak elektrofiller genellikle yüksüz olup daha az elektrofiliktir. Bunlara, Michael akseptörü örnek verilebilir. Sert elektrofiller genellikle küçük ve yüklüdürler. Bunlara ise alkil ya da karbonil karbokasyonlar örnek verilebilir (Clayden, 2001). Yumuşak elektrofiller yumuşak nükleofiller ile orbital etkileşim yoluyla tepkimeye girerken, sert elektrofiller de sert nükleofiller ile elektrostatik etkileşim yoluyla büyük ölçüde tepkimeye girerler. Glutasyon yumuşak nükleofiller için iyi bir örnektir. Çünkü nükleofilik kısmı sülfür atomudur. Nispeten büyük ve elektron bulutları daha polarizedir. Aminler ve diğer azot içeren nükleofiller ise sert nükleofillerdir. Çünkü azot küçük ve sülfüre göre daha az polarizedir.

Reaktif metabolitlerin oluşumunda ve reaktivitesinde, iyi ayrılan grup, halka gerginliği, bir karbonil grubu tarafından çift bağın polarizasyonu (Michael akseptörü) ve elektron çeken grupların varlığı gibi faktörler önemli rol oynar (Utrecht, 2007b).

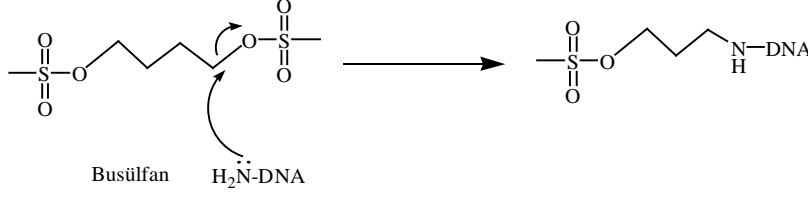
İyi Ayrılan Gruplar genellikle negatif yükler ile çevrilidir. Bu negatif yükler, yükün dağılımıyla kararlı kılınır. İyi ayrılan gruplara örnekler arasında, sülfat, sülfonat, klorür ve asetat verilebilir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. İyi ayrılan gruplara örnekler

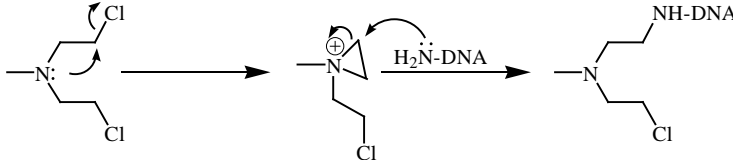
1. GİRİŞ

Antikanser ajanı busülfan, glutasyon veya DNA ile reaksiyona giren iyi bir ayrılan gruba (metilsülfonat) sahiptir (Şekil 1.5.).



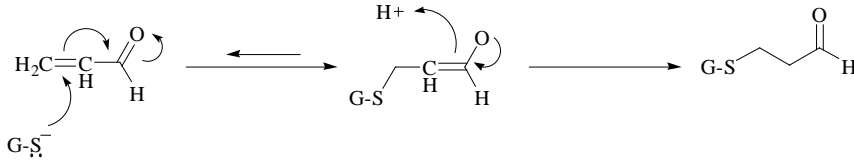
Şekil 1.5. Metilsülfonat iyi bir ayrılan gruptur

Halka Gerginliği bileşiğin reaktivitesini artırır. sp^3 hibritleşmesine sahip olup normal bağ açısı 109° dir. Üç üyeli halka olması durumunda, bağ açısı 60° olmaktadır. Bu durum önemli derecede halka gerginliğine neden olur ve bu sebeple halka açılması meydana gelir. Alkilleyici anti-kanser ajanı olan mekloretoamin, molekül içi reaksiyon ile halka gerginliğine neden olan bir pozitif yüke sahip aziridinium iyonunun oluşumuna yol açar. Böylece nükleofillere karşı çok reaktif olur (Şekil 1.6.).



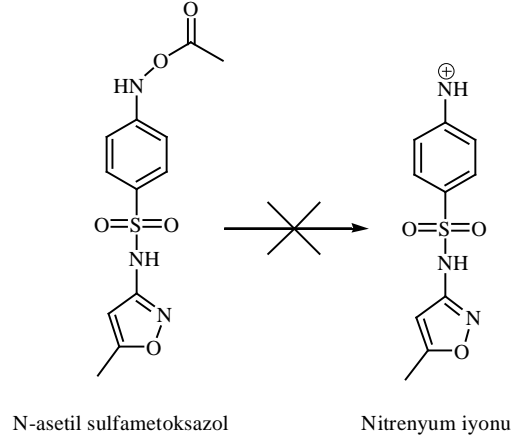
Şekil 1.6. Mekloretoamin, yeniden düzenlenmeye maruz kalarak gergin aziridinium iyonunun oluşumuna yol açar ve bu da nükleofil ile reaksiyona girer

Michael Akseptörü bir alkenin çift bağına komşu karbonil grubu ile konjugasyon yolu ile alkenin çift bağı polarize olduğunda elektrofilik olur ve tiyol nükleofili ile reaksiyona girer. Michael akseptörünün en basit örneği olarak karsinojen olan akrolein verilebilir (Şekil 1.7.). Aynı nedenle, amino kinonlar, kinon metidler ve kinonlar gibi yapılarda reaktiftir.



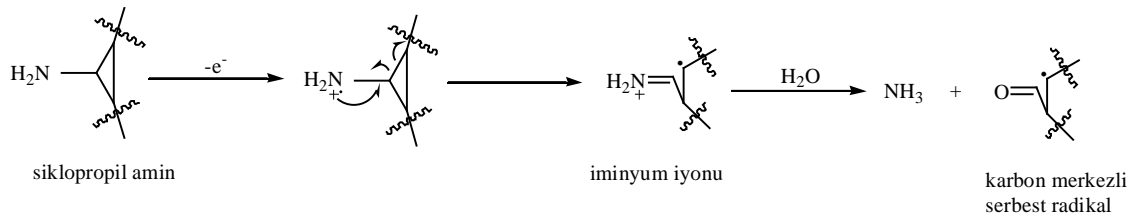
Şekil 1.7. Akrolein ile glutasyonun Michael's reaksiyonu

Elektron Çeken Gruplar varlığında, elektrofil çok reaktif olabilir. Eğer reaktif metabolit oluşumu sırasında pozitif bir yük oluşuyor ise, bu reaktif metabolit oluşumu çok zor olabilir. Örnek olarak N-asetil sulfametoksazol, *para*-sülfonamid gruplarının kuvvetli elektron çekici özelliklerinden dolayı nitrenyum iyonu oluşumu sırasında asetat grubunu kaybetmezler (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. N-asetil sulfametoksazolün sülfonamid grubunun elektron çekme etkisi ile nitrenyum iyonu oluşumunun engellenmesi

Serbest Radikaller ilaçlar tarafından oluşabilen reaktif ara ürünlerin diğer bir çeşitidir (Kubow ve Wells 1989). Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Kovalent bağ oluşturmak üzere diğer bir serbest radikal ile reaksiyona girebilir, yeni bir radikal oluşturmak için nötr molekülden hidrojen atomu koparabilir veya anyon ve radikal katyonu oluşturmak için elektron koparabilirler. Serbest radikal mekanizmasına örnek olarak, üçüncül bir amin olan siklopropil halkasının halka açılması verilebilir (Sun ve ark. 2008) (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. Siklopropil amin halka açılmasının serbet radikal oluşum mekanizması

1. GİRİŞ

Metabolizma reaksiyonları ilaçların enzimatik olarak uğradığı kimyasal değişmelerin türüne göre iki gruba ayrılır. Bunlardan ilki, oksidatif, redüktif ve hidrolitik reaksiyonları kapsayan faz I, ikincisi ise enzimatik sentezle ilaçlara polar yapıların bağlanmasını kapsayan faz II (konjugasyon) reaksiyonlarıdır.

Faz I reaksiyonlarıyla yapıya –OH, –NH₂, –COOH, –SH gibi polar fonksiyonel gruplar sokulur, böylece farmakolojik aktivitede azalma (deaktivasyon), artma (aktivasyon), değişme ve toksisitede artma (intoksikasyon) meydana gelebilir. Faz II reaksiyonları ise, ya yapısında karboksil, alkol, fenol, amin, amid, ürean ve aktif hidrojen içeren gruplar, ya da faz I reaksiyonları ile oluşan fonksiyonel gruplar üzerinden yürür ve ilaçlar aktif olmayan polar metabolitlere dönüşür. Ancak çok hidrofilik moleküllerin büyük bir kısmı enzimatik biyotransformasyona uğramaz, bu nedenle az miktarda metabolit oluşur ve ilacın çoğu değişmeden atılır.

Faz I reaksiyonlarını katalize eden enzimler mikrozomal ve nonmikrozomal enzimler olmak üzere iki çeşittir. Bunlardan mikrozomal enzimler karaciğer parankima hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunurlar. Bu enzimleri karaciğerden izole etmek mümkündür. Bu nedenle gerekli ko-faktörleri (NADP⁺, Mg²⁺, nikotinamid, O₂) ilave etmek suretiyle *in vitro* metabolizma çalışmaları yapılabilmektedir. Nonmikrozomal enzimler de karaciğer ve vucüttaki diğer organların hücrelerinde mevcuttur.

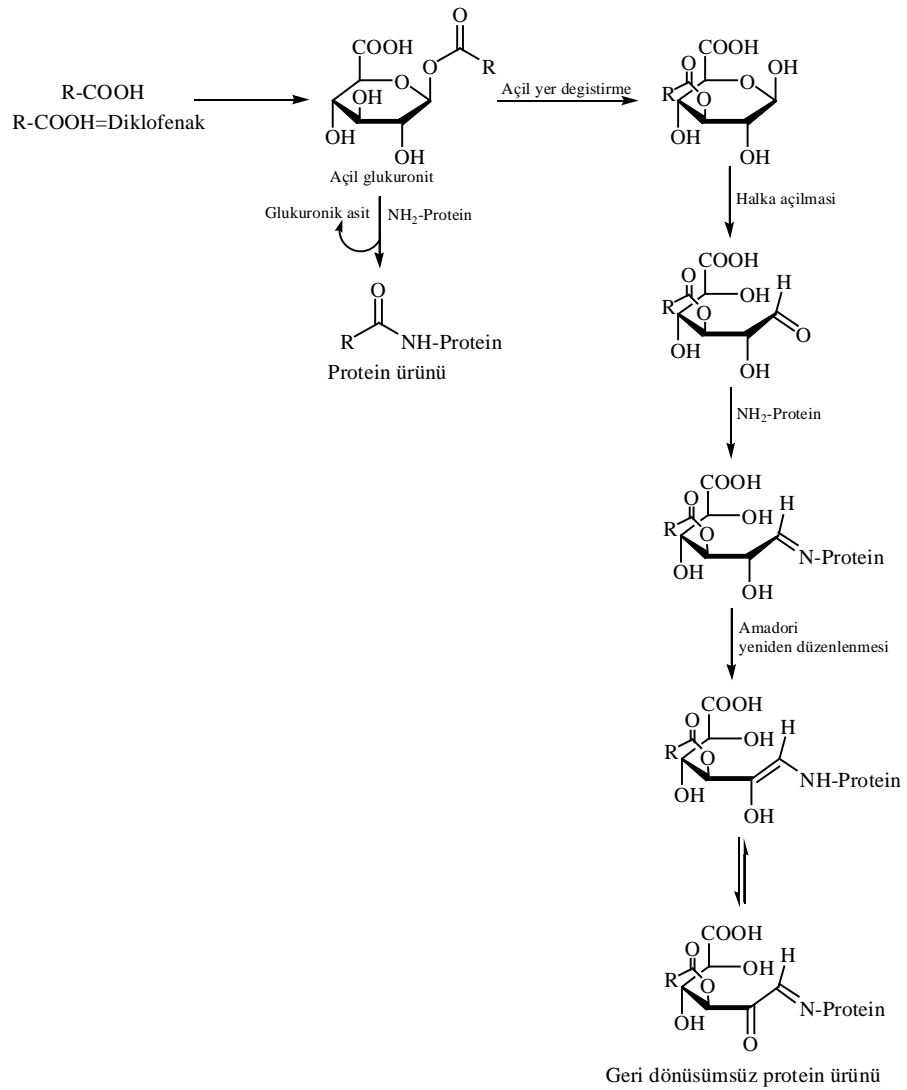
1.7. Faz II Reaksiyonları

Ksenobiyotikler organizmada enzimatik bir sentez reaksiyonu ile iyonize olabilen glukuronik asid, sülfat, amino asit gibi yapılarla kovalent bağ oluşturarak birleşmek suretiyle polar özellik kazandırıp vucuttan atılımını kolaylaştırır. Nadir durumlarda bu konjugatlar toksisiteye yol açan kimyasal olarak reaktif olabilir. Yaygın Faz II metabolik yollara glukuronidasyon ve sülfatasyon örnek verilebilir.

1.7.1. Glukuronik Asitle Konjugasyon (Glukuronidasyon)

Biyolojik sistemlerde glukuronik asit D-glukozdan kolayca sağlanabildiği için, glukuronidasyon en önemli biyotransformasyon reaksiyonlarından biridir. Glukuronidasyon işleminde genellikle hidroksil grupları içeren, fenol, karboksilik asit

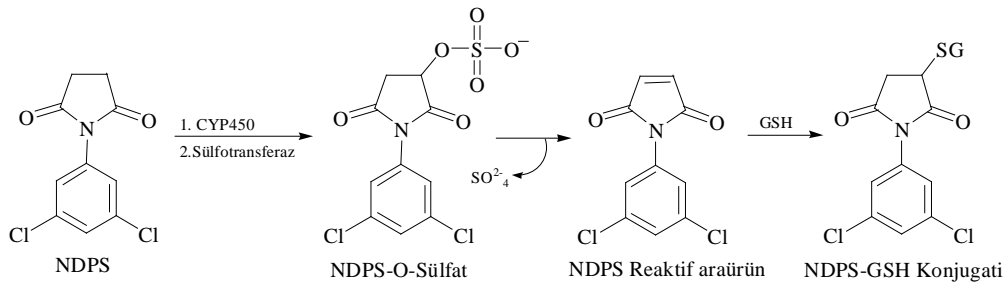
ve alkol gibi ilaç veya başka bir substrat, temizlenir ve detoksifiye edilir. Diklofenak örneğinde, karboksilik asit bir glukuronid haline dönüştürülür. Bu glukuronid reaktiftir ve kovalent bağlanmaya yol açan protein amino grupları ile yavaşça reaksiyona girer (Hargus ve ark. 1994, Ware ve ark. 1998). Bazı durumlarda, açıl glukuronid halka açılmasına maruz kalarak, geri dönüşümsüz protein bağlayıcı oluşumuna yol açabilen amadori ürününü oluşturur (Şekil 1.10.). Karboksilik asitler, reaktif ve iyi ayrılan grup olan Co-A esterler oluşturabilirler. Bu esterler ayrıca, karboksilik asitler ile kovalent bağlanmada önemli ölçüde katkıda bulunabilir (Li ve ark. 2002).



Şekil 1.10. Reaktif bir açıl glukuronid olan diklofenak'ın biyoaktivasyonu

1.7.2. Sülfat Konjugasyonu (Sülfatasyon)

Sülfatasyon, diğer bir faz II metabolik yoludur. SO_3^- fonksiyonel grubu, sülfotransferaz enzimi yoluyla substrata transfer edilir. Bu tür reaksiyonlar için her zaman substrat hidroksil veya fenolik gruplardır. Azot içeren substratlar bu transformasyona uğrayabilir. Genellikle bu sülfat konjugatları toksik değildir ve vücuttan atılabilir. Fakat bazı durumlarda, konjugattaki sülfat grubu reaktif olabilir ve ayrılan grup gibi davranan bir katyon oluşturabilir veya nükleofil ile yer değiştirebilir (Glatt ve ark. 2000). Bu da proteine kovalent bağlanarak toksisiteye yol açabilir. Örnek olarak nefrotoksisiteye neden olduğu bilinen N-(3,5-diklorofenil) süksinimid (NDPS), antifungal bir bileşiğinin biyoaktivasyonu verilebilir. Bu molekülün hidroksil metaboliti N-(3,5-diklorofenil)-2-hidroksisüksinimid (NDHS) toksisiteye neden olan aktive edilmiş O-sülfat için biyoaktivedir (Cui ve ark. 2005) (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Reaktif O-sülfat için antifungal bileşik NDPS'nin biyoaktivasyonu

1.8. Karbon Merkezli Radikaller

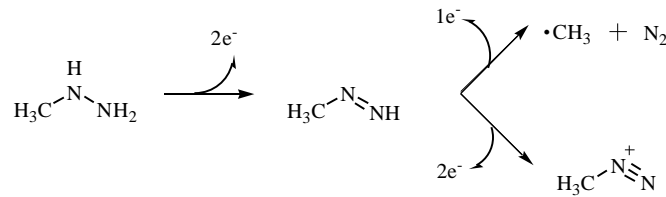
Enediyen antitümör antibiyotikleri keşfedilmeden önce, DNA kesimine aracılık eden çok az karbon merkezli radikal örneği olduğu bilinmekteydi. En basitinden, hem enzimatik hem de kimyasal koşullar altında, metil radikalının DNA kesim etkisi gösterdiği kanıtlanmıştır (Augusto ve ark. 1990). Metil hidrazinin, horseradish peroksidaz ve ferrisiyanat ile oksidasyonu sonucu, pürin halkasını alkilleyerek DNA kesimi gösteren metil radikali yüksek verimle oluşur (Şekil 1. 12.).

Oksi-hemoglobin aracılığı ile, fenelzin (2-feniletihidrazin) oksidasyonu sonucu, direk DNA zincir kesimi gerçekleşmesinden daha çok, alkali-kararlı bölge oluşumunu destekleyen 2-feniletihidrazin radikali oluştuğu söylenmektedir (Şekil 1.13.) (Leite ve ark. 1989).

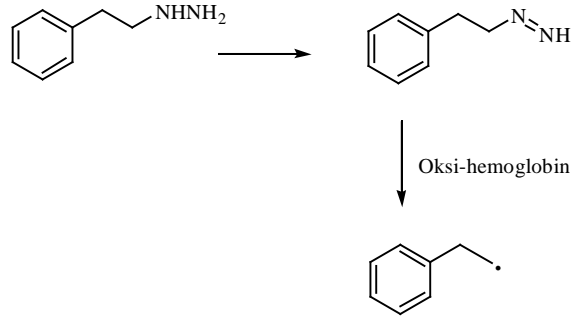
Trimetilenmetan diradikalleri, DNA kesimi üzerine etki göstermez. Bu grubun DNA'ya bağlanabilen bir moleküle takılması diradikallerin yarışmalı dimerizasyonundan daha etkili intramoleküler hidrojen atomu koparılmasına sebep olur (Bregant ve ark. 1994). (Şekil 1. 14.).

Enediyen doğal ürünlerin etkili DNA kesim ajanları olması, sentetik enediyenlerin mekanistik detaylarının çalışılması ve daha etkili kesim aktivitesi elde etmek için kullanılmaktadırlar. DNA'ya bağlanma ünitesi olmayan basit enediyenler (Şekil 1.15.), yüksek konsantrasyonlarda DNA kesim etkisi gösterirler. Siklodekaendien diolleri basit enedienlere bir örnektir (Şekil 1.15, 1.) (Nicolaou ve ark. 1992). Diğerlerinin yanı sıra, propargilik sülfonların (Nicolaou ve ark. 1989), enediyen bileşiklerinden farklı bir mekanizma ile DNA kesimine aracılık ettiği gösterilmiştir (Şekil 1.15. a ve b yolları). Maxam-Gilbert kimyasına benzeyen, DNA' nın nükleofilik azotları ile kumule ara ürünlerinin etkileşimine benzer bir mekanizma olduğu anlaşılmaktadır. Allenilfosfin oksit de (Nicolaou ve ark. 1990) (Şekil 1.15, 3.) DNA kesim aktivitesi göstermektedir. Bu kesim muhtemelen DNA kesimi ile uyumlu, ılımlı sıcaklıklarda siklizasyon bir yapı oluştuktan sonra bir diradikal ara ürününün oluşumu ile gerçekleşmektedir (Jones ve fouad 2002).

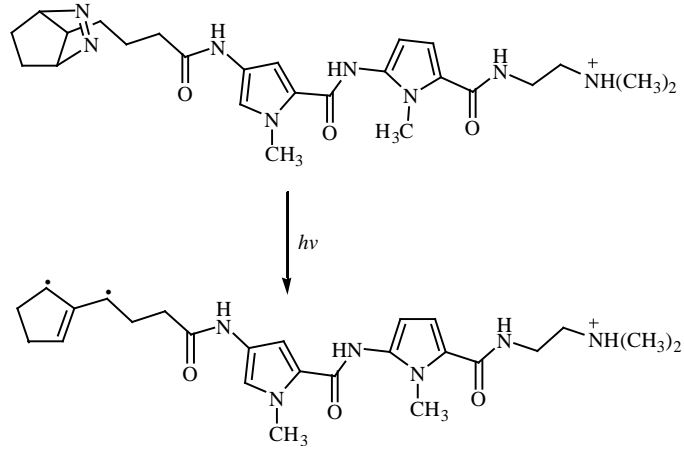
4-alkinil-3-metoksi-4-hidroksisiklo butenonlarda (Sullivan ve ark. 1994) süpercoiled DNA kesimine neden olduğu bilinmektedir. DNA hasarının, 49 °C'de siklobutenonların termal bozunmasından doğan diradikaller (Şekil 1.16.) ile meydana geldiği düşünülmektedir.



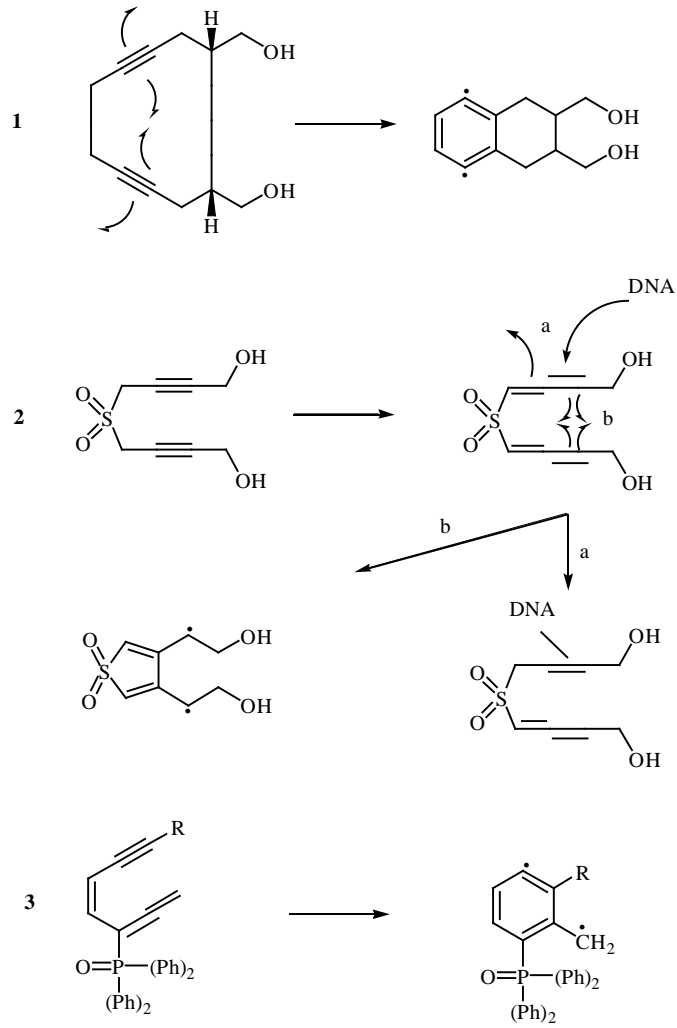
Şekil 1.12. Metilhidrazinin oksidasyonu üzerinden metil radikali oluşumu



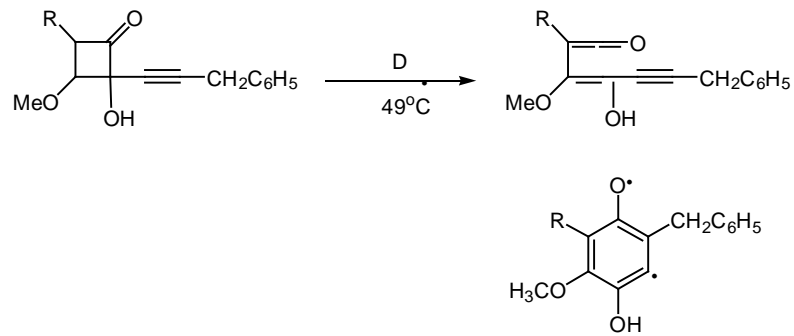
Şekil 1.13. Fenelzinin oksidasyonu ile karbon merkezli 2-feniletıl radikali oluşumu



Şekil 1.14. Bir diazene ürününden oluşan distamisin-bağlı trimetilenmetanın foto-oluşumu



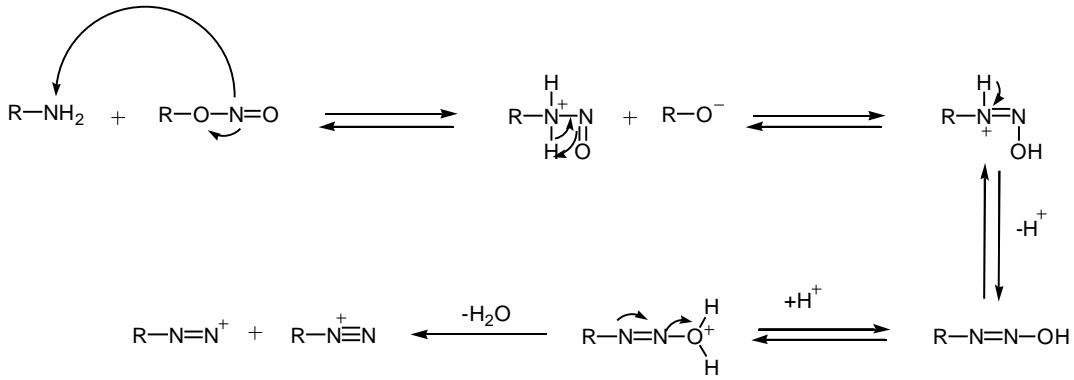
Şekil 1.15. Sentetik enediyenlerin yapıları ve önerilen mekanizmaları: 1 siklodekanenediyne diol, 2 propagirik sülfon, 3 allenfosforin oksit



Şekil 1.16. 4-alkinil-3-metoksi-4-hidroksisiklobutanondan oluşan diradikallerin DNA-kesiminin oluşumu

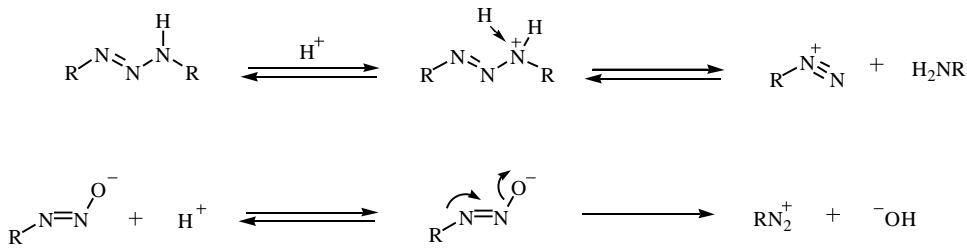
1.9. Diazonyum Tuzlarının Oluşumu ve Bozulması

Arildiazonyum tuzları, alkildiazonyum ürünlerinden daha kararlıdır. Bu nedenle farklı olarak izole edilebilirler. Arildiazonyum tetrafloroborat tuzları, klorür veya bromür tuzlarından daha kararlıdır. Bu nedenle kristal formda diazonyum tuzu elde etmek için yaygınca kullanılırlar. Her ne kadar sodyum nitrit diazolama için çok sık kullanılsa da, organik nitritler (örneğin izoamil nitrit) diazolama esnasında uçucu alkollere dönüştüğü için tercih edilirler (Şekil 1.17.) (Pine 1987). Arildiazonyum iyonlarının kararlılığı, diazonyum grubuna *orto* ve *para* pozisyonunda aril üzerindeki elektron çekici gruplar ile artırılır (Çeken ve Kızıl 2007; Colas ve Goeldner 1999).



Şekil 1.17. Diazolama mekanizması

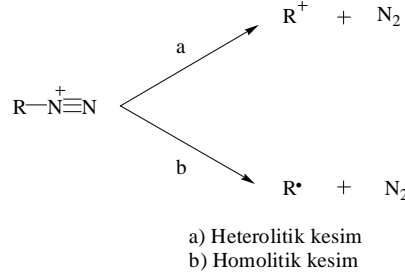
Diazonyum tuzları (Arya 2006), triazinler ve alkandiazotesler gibi bazı reaktif araürünler ile hidroliz edilebilirler (Şekil 1.18.).



Şekil 1.18. Triazinler ve alkanediazoatelerin asit katalizli ayrışmaları

Diazonyum tuzlarının bozulması sırasında moleküler azot ve reaktif türler oluşur (Zollinger 1994). Dediazolama heterolitik bir katyon formu ve homolitik bir radikal formu oluşturmak üzere iki mekanizma üzerinden meydana gelir. Her iki süreçte aynı

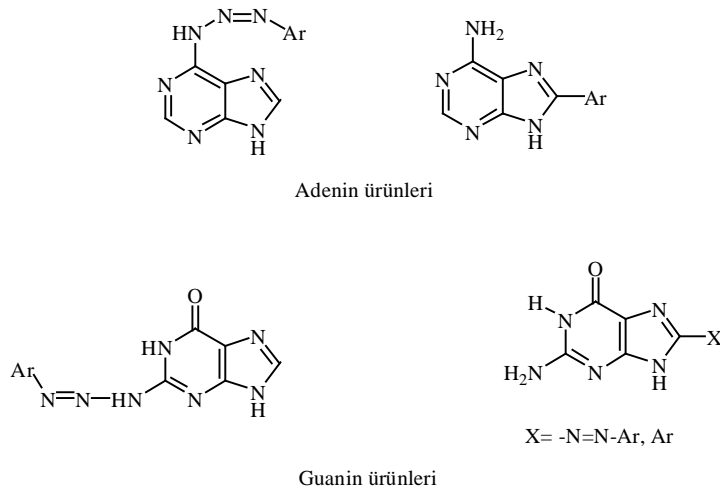
anda meydana gelir. Heterolitik katyon formu (a), termal veya fotokimyasal yol ile aktive olabilirken homolitik radikal formu (b) ise Cu^+ iyonları gibi güçlü indirgeyici ajanlar varlığında gerçekleşir (Quintero ve Miranda 2000) (Şekil 1.19.).



Şekil 1.19. Diazonyum tuzlarının heterolitik ve homolitik formlarının oluşumu

Diazonyum tuzları DNA ile reaksiyona girebilir. Bu reaksiyonlar aril radikalleri veya aril katyonları ara ürünleri yoluyla gerçekleşir, pürin ürünleri veya zincir kesimine yol açabilir.

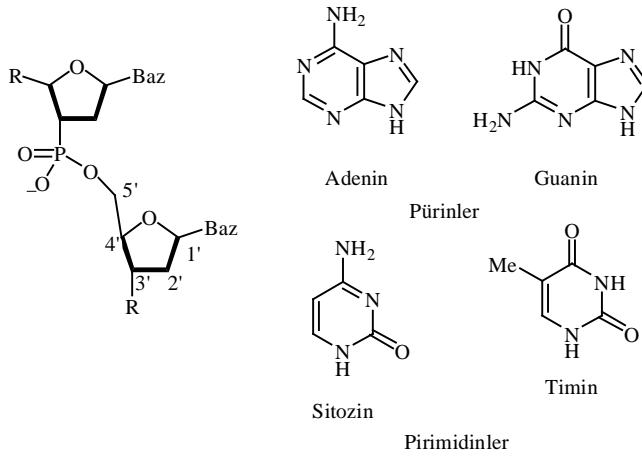
Isı ve ışık ile sulu ortamda benzendiazonyum tuzlarından, aril katyonları oluşur. Bunlar su ile hemen reaksiyon verirken aynı zamanda nükleik asitin fosfodiester omurgasında esterleşebilir (Behr 1989). Stock ve arkadaşları (Stock ve hung 1982), güçlü elektron çekici sübstitünlere sahip benzendiazonyum iyonlarının (-Br, -SO₃H), pürin bazlarına kovalent bağlanma yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir (Şekil 1.20.).



Şekil 1.20. DNA baz ürünleri

1. GİRİŞ

DNA ile diazonyum tuzları reaksiyonunun diğere bir tipi ise, diazonyum tuzlarının homolitik ayrışmasıyla oluşan aril radikalleri reaksiyonudur. Bu radikaller şeker-fosfat omurgasından hidrojen kopararak şeker radikalleri oluşturma yeteneğine sahiptirler. Buda yeniden düzenleme ile nükleik asit iplikçığının kesimine yol açabilir. Çift zincirli DNA iplikçığındeki fosfodiester omurgasının 4' ve 5' pozisyonundaki hidrojenlere çok kolay erişebilirler (Şekil 1.21.) (Tullius ve pogolzeliski 1998).



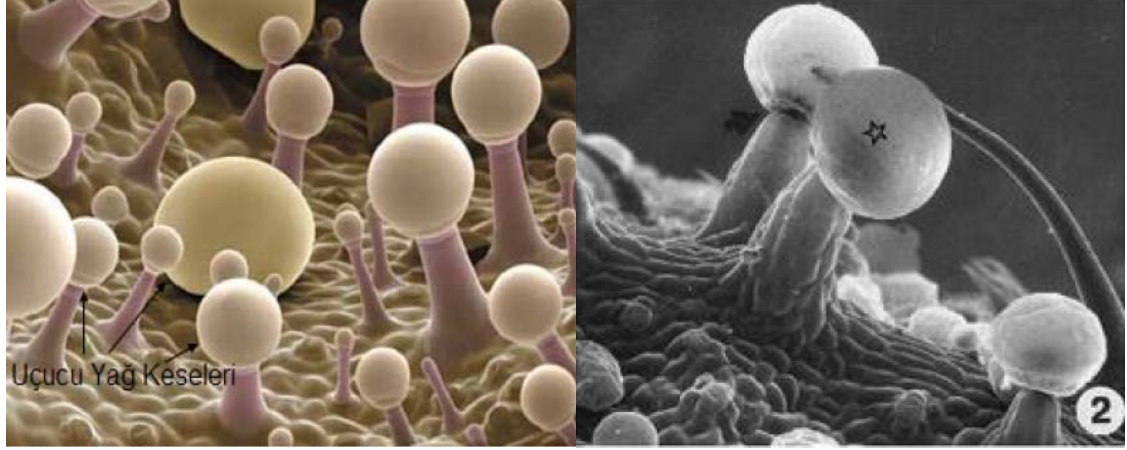
Şekil 1.21. DNA parçasındaki şeker ve baz kısımları üzerinde hidrojen işaretleme

1.10. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar eski çağlardan günümüze kadar bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadırlar (Çelik ve Çelik 2007). Halk arasında kullanılan bu ilaçlar daha sonra bilim adamları tarafından yapılan araştırmalar sonucunda, yüzyılımızda çözümlenemeyen birçok hastalığın tedavisi için umut olduğu ve üretilen sentetik birçok maddenin yerine geçebilen potansiyel bir kaynak olduğu açıklanmıştır. Örneğin, kekik ve lavanta yağlarının yara ve yanıklara uygulandığında iz bırakılmadan iyileştirdiği bilinmektedir (Şarer 1991 ve Kıvanç 1986).

Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan, su veya su buharı destilasyonu ile elde edilen, normal koşullarda sıvı, bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır (Tanker ve Tanker 1990). Genellikle sıvı olan bu karmaşık karışımlar kokulu kimyasal bileşiklerden oluşurlar. Uçucu yağlar ya bitkinin belirli organlarında örneğin taç yaprak, yaprak, meyve, kabuk, meyve sapı gibi ya da bitkinin tüm organlarında ayrıca bazen bir organın belirli dokularında da bulunabilirler.

Bu yağlar bitkilerin bağlı bulunduğu familyalara göre salgı tüyünde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde bulunmaktadır (Şekil 1.22.) (Ceylan, 1987).



Şekil 1.22. Bir kekik türünde elektron mikroskopunda görülen ve salgı tüylerinin ucunda bulunan uçucu yağ keseleri (salgı cepleri)

Uçucu yağlarda yaklaşık 2000'e yakın kimyasal bileşen mevcuttur. Bunların en önemlileri terpenler ve fenil propanlardır. Ayrıca çok sayıda su buharında uçucu olan azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı da görülmüştür (Ceylan 1987).

1.10.1. Uçucu Yağların Biyolojik Etkileri

Türkiye bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerden biri olmanın yanı sıra köklü bir kültüre de sahiptir. Bu durum, bitkisel ilaçların daha etkili, daha toksik ve daha pahalı olan sentetik ilaçlar ile bir arada kullanımlarında tamamlayıcı rol oynamalarına olanak sağlamakta, tek başlarına ise alternatif terapi aracı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistemlerin enfeksiyonlarında iyileştirici ve antiseptik amaçlı olarak kullanımlarını gündeme getirmektedir (Verastegui 1996). Bu nedenle ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmektedir (Abaskal ve Yarnell 2002).

Doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasının yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermektedir. En fazla uçucu yağ içeren familyalar ise *Pinaceae*, *Laureaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae* (*Labiatae*), *Apiaceae* (*Umbelliferae*), *Zingiberaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Piperaceae*, *Iridaceae*, *Chenopodiaceae*, *Verbenaceae*, *Brassicaceae* ve *Ranunculaceae*'dir. Bu familyalardan bazıları ayrı bir öneme sahiptir. Örneğin *Labiatae* familyasında bulunan, birçok Akdeniz ve Avrupa Ülkeleri'nde üretimi yapılan *Thymus*,

1. GİRİŞ

Lavandula, *Melissa*, *Mentha* türleri ve diğer bazı bitkiler değerli uçucu yağ kaynaklarıdır (Ceylan 1996). Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Uçucu yağların etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterir (Bağcı ve Dığrak 1997).

Sekonder metabolitler çoğunlukla antifungal (mantarlara karşı), antibakteriyal (bakterilere karşı), antivirütik (antiviral), antimikrobiyal (mikroplara karşı) ve antioksidan (oksitlenmeye karşı) etkilidirler. Örneğin; nane uçucu yağının antibakteriyal etkisi, okaliptus ve oğulotu uçucu yağlarının antiviral etkisi, biberiye ve adaçayı uçucu yağlarının antioksidan etkisi çok güçlüdür (Oğur 1994).

Kekiğin (*Origanum sp.*) kurutulmuş yaprak, çiçek ve tomurcuklarının su buharıyla damıtılması sonucu %2 ile %8 oranında elde edilen uçucu yağ (esans), kekiğin kendine özgü kokusunu taşır. Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ, çok güçlü mikrop öldürücü (antimikrobiyal) etkilere sahip olduğundan bakteri (antibakteriyal) ve mantar (antifungal) enfeksiyonlarında etkilidir (Başer 2001).

Yapılan bir çalışmada Türkiye’de yayılış yapan ve halk arasında ayvadana, ayvadani ve mayasilotu gibi adlarla bilinen *Achillea setacea Waldst. & Kitt*’in uçucu yağ bileşenleri ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bu bitkinin kurutulmuş çiçekli kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS ortamında bileşenlerine bakılmış ve bileşenlerinden 1,8- cineole’nin antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada *Achillea millefolium L.*, *Achillea crithmifolia Waldst. & Kitt.* ve *Achillea kotschy Boiss. subsp. kotschy*’in uçucu yağ bileşenleri ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bu bitkilerin uçucu yağındaki ana bileşenlerinden olan cisascaridol ve 1,8-cineole’nin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Karamenderes ark. 2003). Ayrıca sarımsak, tarçın, köri, hardal, fesleğen, zencefil ve diğer bazı bitkiler antimikrobiyal özellikler gösterdikleri belirtilmektedir (Marino ve ark. 1999).

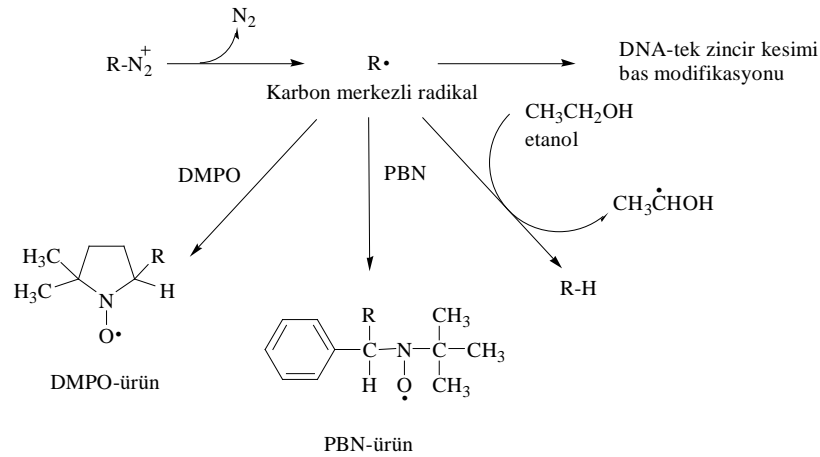
Yine yapılan bir çalışmada *Coridothymus capitatus*, *Origanum onites*, *Saturea cuneifolia*, *Sideritis siphylea* türlerinden elde edilen uçucu yağların antioksidan etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Öztürk ve Konyalıoğlu 2002).

Aromatik amin içeren ilaçların metabolizmaları sonucu oluşan reaktif metabolitlerinin, başta proteinler olmak üzere hücrenin diğer biyolojik makromolekülleri üzerinde hasar oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu durumda yan etki olarak agranülositose (nötrofil azalması) neden olduğunu bilinmektedir. Oluşan bu hastalık neticesinde, bağışıklık sistemi zayıflamakta ve en küçük bir hastalık etmeninde bile insan enfeksiyon kapabilmektedir. Bu durum çoğu hasta için hayati risk taşımaktadır. Bu çalışmada, bu tür ilaçların meydana getirmiş olduğu hasarı, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle model çalışma olarak aromatik halkaya sahip amin gurubu içeren 4-kloro-2-nitro anilin molekülü seçilmiştir. Bu amaçla, molekülün öncelikle diazonyum tuzu sentezlenip bir elektron donör varlığında, aril radikali oluşturup protein ve DNA üzerinde hasar oluşturulup, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının bu hasarı koruyucu etkisi araştırılmıştır. 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat molekülünün ayrıca karbon merkezli radikal söndürme etkisi olduğu bilinen etanol ve β -merkapt etanol varlığında, protein ve DNA üzerine olan etkisine bakıldı.

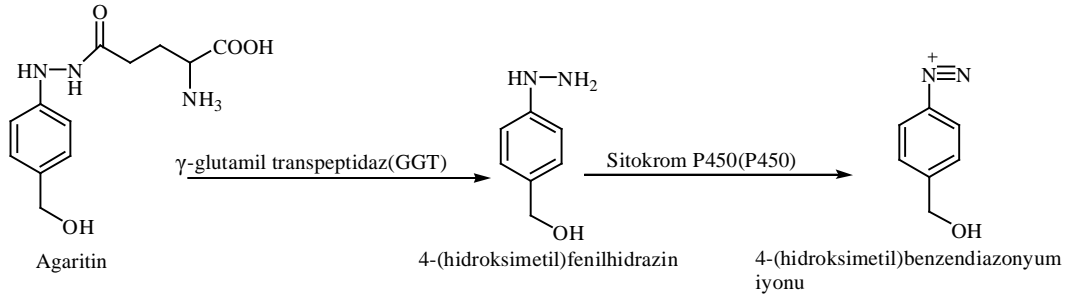
Daha sonra antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid ilacının diazonyum tuzu sentezlendi. Sentezlenen prokainamidin tetrafloroborat tuzundan, bir elektron donör varlığında aril radikali oluşturup, bu radikalin protein ve DNA üzerinde oluşturduğu hasar incelendi. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının protein ve DNA üzerinde oluşan hasarı önleme etkisi çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

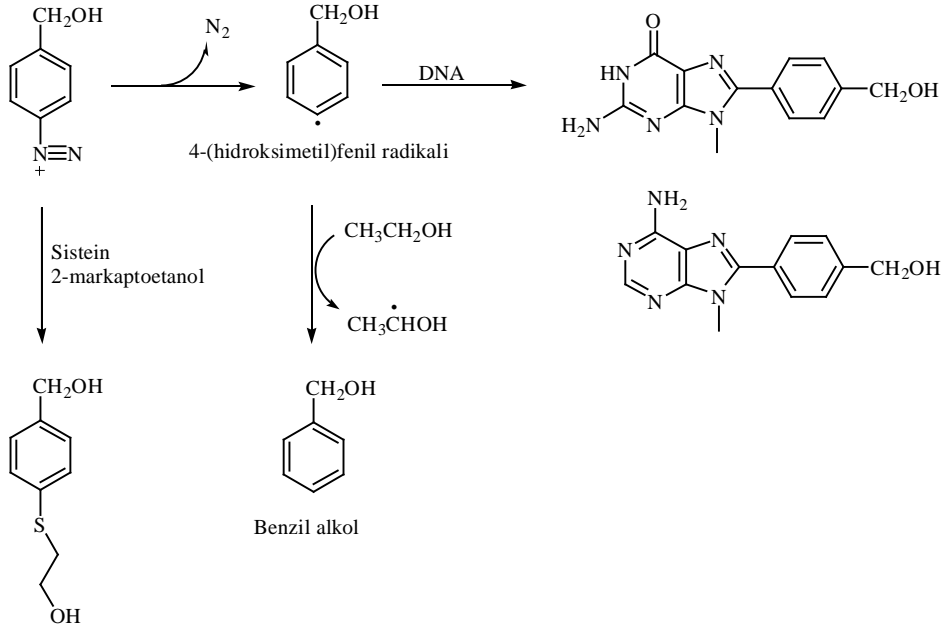
Hiramoto ve arkadaşları tarafından, yüksek mutajenik etkiye sahip olduğu bilinen *Salmonella typhimurium* bakterisinden izole edilen 2-aminofluorenin, fluoren-2-diazonyum (FD) tuzuna dönüştürüp DNA kesim aktivitesini araştırmışlardır. EPR spektroskopisi ile 5,5-dimetil-1-prolin-N-oksit (DMPO) ve N-tert-bütilfenilnitron (PBN) kullanılarak karbon merkezli radikal olan fluoren gibi radikaller tespit edilmiştir. Ayrıca FD'nin agaroz jel elektroforezi ile DNA kesimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Radikal söndürücü etkileri olduğu bilinen etanol, 2-merkaptetanol ve sistein ile muamele edildiğinde oluşan ürünlere bakılarak bu mekanizmanın aril radikali metabolizması üzerinden yürüdüğü görülmüştür (Hiramoto 1994).



Hiramoto ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Agaricus bisporus* mantarında bulunan Agaritinin metaboliti olan 4-(hidroksimetil) benzendiazonyum (Şekil 2.1.) tuzunun DNA kesim etkisini incelemiştir. Daha sonra sistein, etanol ve β-merkaptetanol gibi bazı radikal söndürücüler varlığında DNA kesim etkisini önleme aktivitesine bakılmıştır. Bu maddelerin, DNA kesimi üzerinde etkili olan karbon merkezli radikalleri söndürdüğü görülmüştür (Şekil 2.2.). Etanol ve β-merkaptetanol varlığında diazonium tuzunun DNA kesim etkisinin %18 oranında, sistein varlığında ise bu değer %26 oranında azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar kesimin karbon merkezli radikal üzerinden gerçekleştiği düşüncesini doğrulamıştır (Hiramoto 1995).

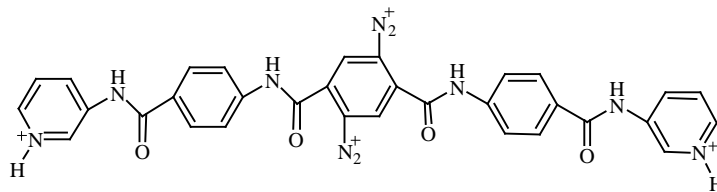


Şekil 2.1. Agaritinin biyoaktivasyon yolu



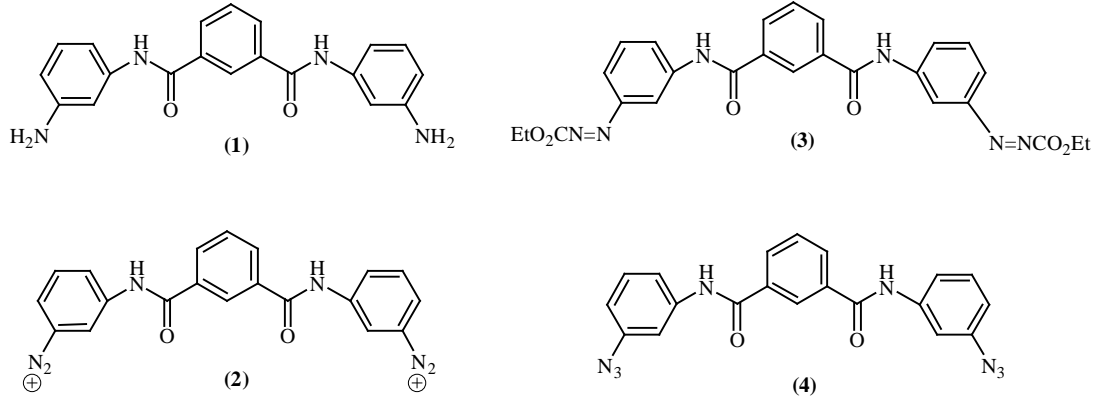
Şekil 2.2. Karbon merkezli radikallerin söndürülmesi

Dev P. Arya ve arkadaşları tarafından, farklı iki aril halkasında diazonyum grubu içeren 1,4-bisdiazonyum bileşiklerinin, bakır klorür varlığında 1,4-diradikalleri oluşturarak enediyen antibiyotikleri gibi DNA'yı kestiğini göstermişlerdir (Dev P. Arya 1995) (Şekil 2.3.)

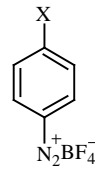


Şekil 2.3. 1,4-Diradikalleri oluşumu

Jebaratnam ve arkadaşları tarafından, Adenin ve Timin baz çiftlerine spesifik olarak bağlanabilen aril diamin (1) bileşiğini sentezleyip bu bileşiği öncü kabul ederek DNA kesimini gerçekleştiren bis-diazonyum (2) ve bis-azoester (3) bileşiklerini ve DNA'ya çapraz bağlanabilen bis-azid (4) bileşiğini sentezleyip, DNA jel elektroforezi deneyi ve UV-visible absorbans değerlerine bakarak (4) bileşiğinin diğer bileşiklere oranla daha fazla DNA çift sarmalını kestiğini tespit etmişler (Jebaratman 1995).



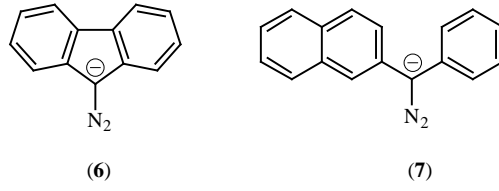
Reszka ve arkadaşları tarafından, diazonyum tuzları (5a-d)'yi kullanarak, diazonyum bileşiklerinin elektron donör varlığında aril radikaline dönüştüğünü EPR (spin yakalama) spektrumlarını inceleyerek bulmuşlardır. Bu çalışma sulu çözeltide aril radikali elde etmek için arendiazonyum iyonlarının indirgenmesinin uygun metod olduğunu göstermiştir. Sonuçta, bu araştırma biyolojik indirgeyici maddelerin ArN₂⁺ nu parçalayarak aril radikaline dönüştürme yeteneğine sahip olduğunu doğrular (Reszka 1995).



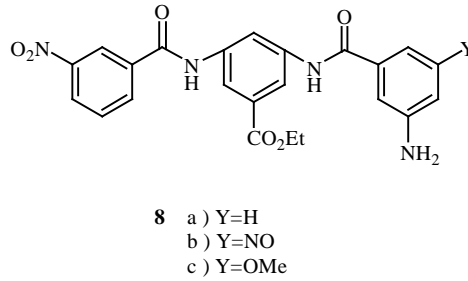
- 5 a) X=MeO
b) X=Cl
c) X=Br
d) X=NO₂
e) X=N(Et)₂

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yine Dev P. Arya ve arkadaşları tarafından, 9-Diazofluoren (6) ve β -naftal fenil diazometan (7) bileşiklerinin bakır asetat varlığında, oksijenli ortamda pBR322 plazmid DNA'yı kestğini göstermişlerdir. Reaksiyonları karanlıkta yaptıkları için kesim mekanizmasının ya karbon merkezli radikalın DNA deoksiriboz şekerinden hidrojen atomu koparmasıyla, ya da bakır asetatın DNA kesim etkisi olan Cu(I)-Oksijen kompleksi veya hidroksil radikali gibi aktif oksijen türleri oluşturarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Dev P.Arya 1995).

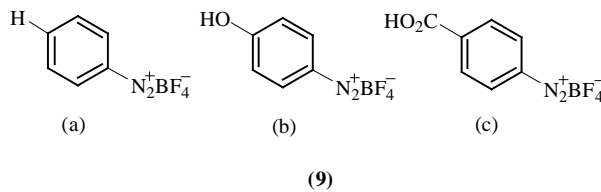


Warner ve arkadaşları (2002), süstitüe triarilamidler (8a-c) sentezleyerek bunların DNA kesim etkisini incelemişler. Kesim etkisinin $a > c > b$ olduğu gözlemlenmiştir (Warner 2002) (Şekil 2.3.).

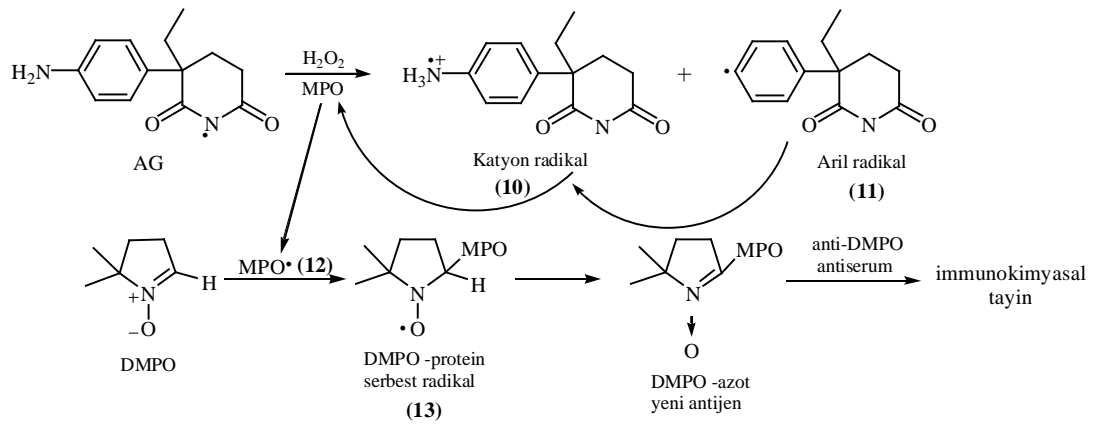


Şekil 2.4. Sentezlenen süstitüe triarilamidler

Kızıl ve arkadaşları (2003), aromatik halka üzerindeki üç farklı süstüentin (9a-c) benzendiazonyum tetrafloroborat tuzlarını sentezleyip DNA kesim üzerindeki etkisini incelemiş olup yapılan deneyler sonucunda, süstüentlerin radikal oluşumunda ve DNA kesimi üzerinde ciddi bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir (Kızıl ve ark. 2003).

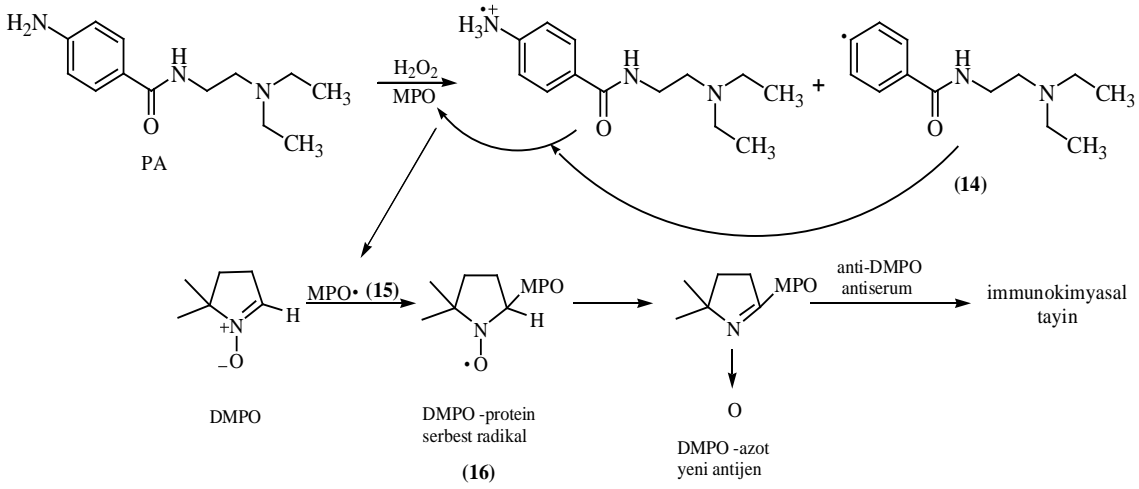


Siraki ve arkadaşları tarafından, Aminoglutethimid (AG)'nin, myeloperoksidaz (MPO) ve H_2O_2 varlığında metabolizması sonucu, N-merkezli radikal (10) ve aril radikali (11) oluşturduğunu, bu radikallerin MPO üzerinde bir MPOprotein radikali (12) meydana getirdiği gösterilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin N-oksit) antikoru kullanılarak, bunun MPOprotein radikali ile DMPO -MPO formu oluşturduğu görülmüştür (13). Elektron spin rezonans yöntemi kullanılarak bu oluşum tespit edilmiştir. Aminoglutethimidin biyoaktivasyonu sonucu oluşan serbest radikal metabolitleri, MPO protein serbest radikali oluşumuna aracılık ettiği ve bununda agranülositoz oluşumunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Şekil 2.4.). (Siraki 2007)



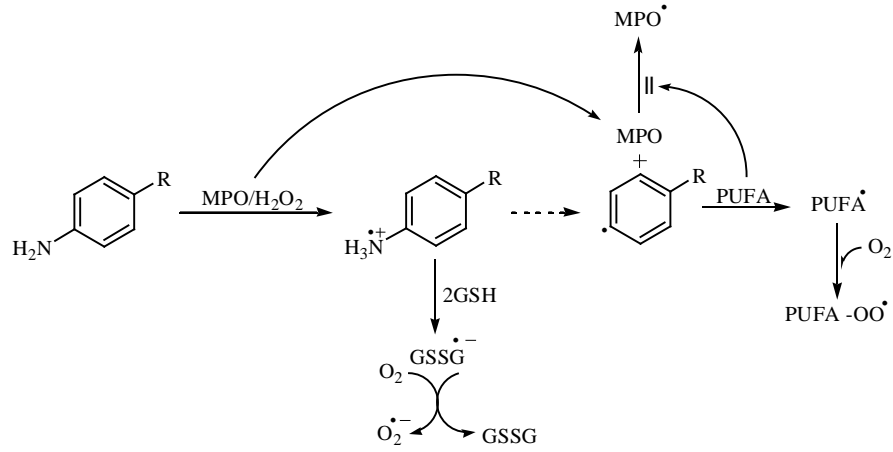
Şekil 2.5. Aminoglutethimid'in biyoaktivasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin inhibisyonu

Bir başka çalışmada Siraki ve arkadaşları tarafından, Prokainamid (PA), myeloperoksidaz (MPO) ve H_2O_2 varlığında metabolizması sonucu, aril radikali oluşturduğunu (14), bu radikalın MPO üzerinde bir MPOprotein radikali meydana getirdiği iddia edilmiştir (15) ve yapmış oldukları *in vitro* çalışmalarda DMPO antikoru kullanılarak, bunun MPOprotein radikali ile DMPO-MPO formu (16) oluşturduğu görülmüştür. Elektron spin rezonans yöntemi kullanılarak bu radikal oluşumu tespit edilmiştir. Prokainamidin biyoaktivasyonu sonucu oluşan serbest radikal metabolitleri, MPO protein serbest radikali oluşumuna neden olduğu ve bununda agranülositoz oluşumunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Şekil 2.5.). (Siraki 2008)



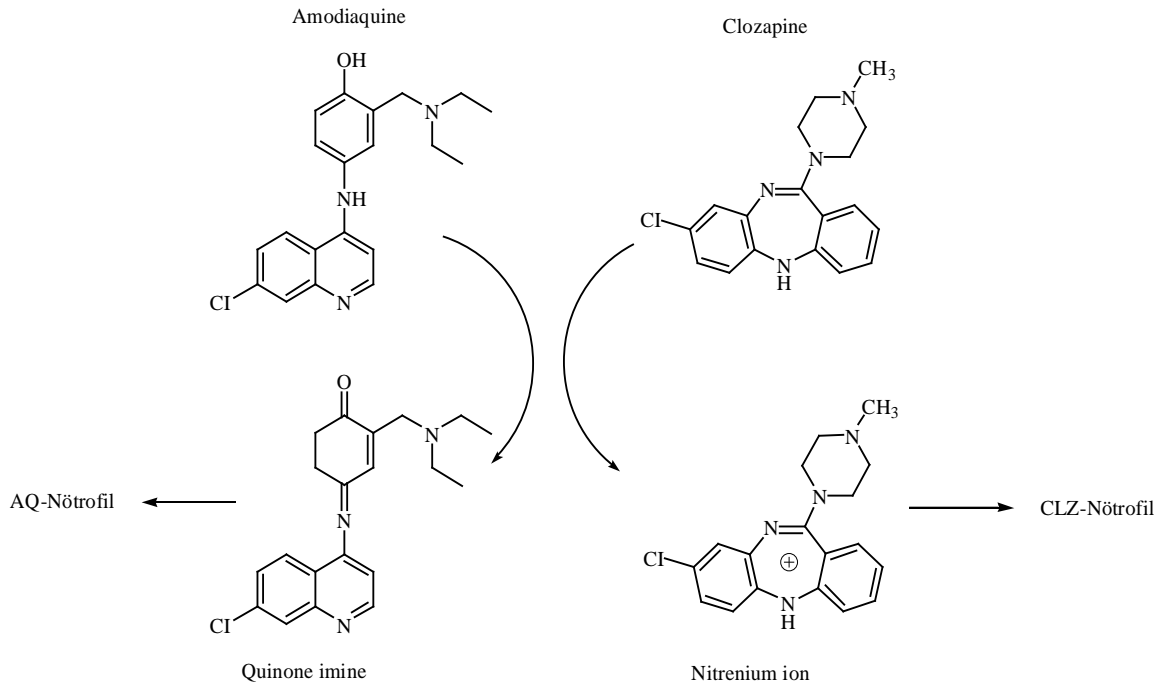
Şekil 2.6. Prokainamid'in biyoaktivasyonu sonucu oluşan metabolitlerinin inhibisyonu

Narwaley ve arkadaşları tarafından, aromatik amin ilaçları insanlarda myeloperoksidaz (MPO) ve H₂O₂ varlığında metabolizması sonucu aril radikallerine dönüşmektedir. Bu radikaller (MPO)/H₂O₂ metabolizması aracılığıyla bir protein radikali oluşturmaktadır. Bu durum ilaca bağlı agranülositoz oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada at peroksidaz enzimi kullanılarak, anilin-bazlı bileşiklerden oluşan aril radikallerin, dokosahekzaenoik asit (DHA), linoleik asit (LA) ve GSH (glutatyon) tarafından söndürülme aktiviteleri, EPR spin-yakalama yöntemi kullanılarak, MNP (2-metil-2-nitrosopropan) ile test edilmiştir. Oluşan bu radikallerin linoleik asit ve dokosahekzaenoik asit varlığında önemli derecede söndürüldüğü, GSH da ise bu söndürme aktivitesinin daha zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs), aromatik amin ilaçlarının metabolizması sonucu meydana gelen aril radikallerini söndürdüğü ve protein radikal oluşumunu önlediği ileri sürülmüştür (Şekil 2.6.) (Narwaley 2011).



Şekil 2.7. Vücutta oluşan fenil radikallerin, GSH ve çoklu doymamış yağ asitleri tarafında söndürme reaksiyonu

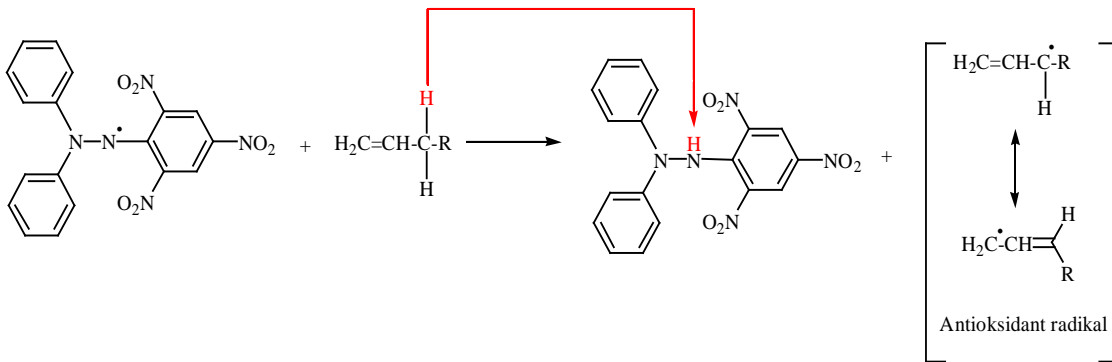
Alexandra ve arkadaşları tarafından, myeloperoksidaz enzimi (MPO) ve NADPH oksidazın, amodiaquine (AQ) ve clozapine (CLZ) ilaçlarının biyoaktivasyonu sonucu oluşan reaktif metabolitleri nötrofillere kovalent bağlanarak oluşan idiyosinkratik agranülositoz üzerindeki rolünü araştırmışlar. Yapılan nakavt (belirli bir geni laboratuvarında bozulmuş fare) fareler üzerindeki deneyler sonucunda, MPO veya NADPH oksidazının önemli roller oynadığı, ancak başka enzimlerinde bu oksitleme üzerindeki öneminin belirgin ölçüde olduğunu ön görmüşlerdir (Alexandra 2014).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hiramoto ve arkadaşları tarafından, okside olmamış linoleik asit (LA) ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL), serbest radikaller sonucu oluşan DNA kesimini önlediğini rapor etmişlerdir. H_2O_2/Fe^{2+} iyonu, 2'-azobis(2-aminidopropan)hidroklorür (AAPH) ve 4-hidroksimetil benzen diazonyum tuzu tarafından oluşan serbest radikallerin neden olduğu DNA kesimi, okside olmamış linoleik asit varlığında azaldığını tespit etmişler. Elektron spin rezonans (ESR)'daki radikallerin spin yoğunluğu, LA varlığında azaldığını gözlemlemişler. Oksitlenmemiş LDL'inde, askorbik asit/Cu(II) iyonu, askorbik asit/Fe(II) iyonu, peroksinitrit ve AAPH- kaynaklı DNA kesimini önlediğini yapmış oldukları çalışmalarda tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, DNA kesimine neden olan serbest radikallerin potensi, yağ asiti ve lipoproteinler ile azaltıldığını öne sürmüşler (Hiramono 2003).

Wojtunik ve arkadaşları tarafından, monotерpenlerin yapısal elemanlarının antioksidant aktiviteden sorumlu olduğunu iddia etmişler. DPPH· metodunu kullanarak spektrofotometrik olarak aktivitesi belirlemişler. Monoterpenlerin zincir kırıcı antioksidant aktivitesinden pi bağlarının sorumlu olduğu, konjüge çift bağların bloke edilmesi ile monotерpenlerin antioksidant aktivitesinde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir. Yapmış oldukları araştırmalar sonucunda, , monotерpenlerin güçlü antioksidant aktivitesi, deneylerde kullanılan çözücünün polaritesine bağlı olduğunu ileri sürmüşler (Wojtunik 2014).



Şekil 2.8. DPPH· ve monotерpenler arasındaki olası reaksiyon mekanizması

Bourwieg ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'dan luteolin 7-glukozit, luteolin 7-rutinozit, luteolin 7-glukuronit, apigenin 7-glukuronit, akasetin 7-rutinozit, diosmetin 7-rutinozit, hesperetin 7-rutinozit, eriyodiktiyol 7-rutinozit, akasetin ve eriyodiktiyol izole etmişlerdir (Bourwieg 1973).

Bourwieg ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'dan 7- β -(6-O-ramnopiranozil-D-glucopiranoziloksi)-5-hidroksikro- mon elde etmişlerdir (Bourwieg 1974).

Khan ve arkadaşları tarafından, *M. arvensis*'ten sitosterol- β -D-glukozit, *l*-mentil- β -D-glukozit, *l*-mentil-6'-O-asetil- β -D-glukozit, *lambda*-mentil- β -D-glukozit, 3-O- β -sitosteril-glukopiranozil-(1 α →2)-fruktofuranozit ve sukroz izole etmişlerdir (Khan 1997).

Monte ve arkadaşları tarafından, Brezilya'da yetişen *M. villosa*' dan HPLC ile oniki adet triterpen izole etmişlerdir (Monte 1997).

Al-Hazimi ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'dan β -sitosterol, ursolik asit, luteolin, hesperetin 7-rutinozit ve 3'-hidroksi-4',5,6,7-tetrametoksiflavon izole edildi. Hesperetin 7-rutinozit asetat bileşiği ilk defa bu çalışmada elde etmişlerdir (Al-Hazimi 1988).

Monte ve arkadaşları tarafından, *M. villosa*' dan yeni bir triterpenoit (metil 2 α ,3 β ,24-tri-O-asetilolean-12 α -kloro-28,13 β -olit) izole etmişlerdir (Monte 1998).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zaidi ve arkadaşları tarafından, Menhta türlerinden izole ettikleri flavon aglikonları Tablo 2.1'deki gibidir (Zaidi 1998).

Tablo 2.1. *Menhta* Türlerinden İzole Edilen Flavon Aglikonları

<i>Bileşikler</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. citrata</i>	<i>M. longifolia</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. aquatica</i>	<i>M. suaveolens</i>	<i>M. pulegium</i>
Thymonin	+	-	+	+	+	+	+
Thymusin	+	-	-	-	-	+	+
5,6-Dihidroksi-7,8,3'.4'- tetrametoksiflavon	-	-	-	-	-	+	-
Pebrellin	+	-	-	-	-	-	-
Jaceosidin	-	-	-	-	-	+	+
Hispidulin	-	-	-	-	-	+	-
Peetolarigenin	-	-	-	-	-	-	+
Ladanein	+	-	-	-	-	+	-
Sorbifolin	+	-	-	-	-	+	+
Pedalitin	-	-	-	-	-	-	+
5,6,4'-Trihidroksi-7,8- dimetoksiflavon	-	-	-	+	+	-	+
5,6-Dihidroksi-7,3'.4'- trimetoksiflavon	+	-	-	-	-	-	-
5-hidroksi-6,7,3'.4'- tetrametoksiflavon	-	-	-	-	-	-	+
Salvigenin	+	+	-	-	-	-	-
Nodifloretin	-	-	-	-	-	+	-
Xanthomierol	+	-	-	-	-	-	-
Gardenin B	+	+	-	-	-	-	-
Sideritoflavone	+	-	-	-	-	-	-
Gardenin D	+	-	-	-	-	-	-
5-O-Desmethylnobiletin	+	-	-	-	-	-	-
Apigenin	+	-	-	+	-	+	+
Acacetin	+	-	+	+	-	-	-
Luteolin	+	-	-	+	-	+	+
Diosmetin	-	-	-	+	-	-	-
Chrysoeriol	-	-	-	-	-	-	+

Voirin ve arkadaşları tarafından, yaptıkları çalışmada *M. aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* ve *M. × piperita*'dan yirmi flavon elde etmişlerdir (Voirin 1999).

Sharaf ve arkadaşları tarafından, Suudi Arabistan'da yetişen *M. longifolia*'nın toprak üstü kısımlarından 3 yeni flavonoit (trisetin 7-*O*-metileter 3'-*O*-glukozit 5'-*O*-ramnozit, trisetin 3'-*O*-glukozit 5'-*O*-ramnozit, trisetin 3'-*O*-ramnozil-(1→4)-ramnozit) ile 6 bilinen flavon glikozit (lucenin-1, luteolin 7-*O*-glukozit ve 7-*O*-neohesperidozit, isoorientin, vicenin-2) elde etmişlerdir (Sharaf 1999).

Jahan ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'dan 5,8,4'-trihidroksi-6,7,3'-trimetoksiflavon isimli yeni bir flavonoit ve bilinen üç flavon mirisetin 4'-metil eter-3-*O*-ramnozit, 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon ve 5-hidroksi-7,8,2',3'-tetrametoksiflavon elde etmişlerdir (Jahan 2001).

Ghoulami ve arkadaşları tarafından, Fas'ta yetişen *M. longifolia*'dan hazırlanan etil asetat ekstresinin potansiyel anti-HIV etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. (Saaid ve ark. 2003). Yine Fas'ta yetişen *M. longifolia*'dan beşi bilinen biri yeni (5,7,4'-trihidroksi-6,2',3'-trimetoksiflavon) olmak üzere altı flavonoit elde etmişlerdir (Ghoulami 2001).

Ali ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'dan yeni bir madde olan longifon (mentonun klorlu türevi), iki yeni β -sitosterol glikozit türevi olan longiside-A ve -B, ve yeni bir flavanon glikozit (longitin) elde etmişlerdir (Ali 2002).

Al-Mutabagani ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinden naringin (5,7,4'-trihidroksi 7-*O*-neohesperidozit) ve apigenin 7-*O*-glukozit ile birlikte çok sayıda metoksi grubu taşıyan iki flavon izole edildi. Ayrıca oleanolik asit ve fitalik asitin dioktil esterini elde etmişlerdir (Al-Mutabagani 2004).

Khattak ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın yaprak ve gövdesinden hazırlanan etanol ekstrelerinin yüksek fitotoksik aktiviteye, gövdesinden hazırlanan ekstreinin *Trichophyton longifusus* ve *Microsporum canis*'e karşı sırasıyla %75 ve %65 antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir (Khattak 2004).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ali ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın metanol ekstresinden longifoamit A {6'-tetrakosenamit, (6'Z)-N-[2,3-dihidroksi-1-(hidroksimetil) oktadesil]} ve B {6'-tetrakosenamit, (6'Z)-N-[2,3,4-trihidroksi-1-(hidroksimetil) oktadesil]} adlı iki yeni bileşik elde etmişlerdir (Ali 2006).

Oinonen ve arkadaşları tarafından, *M. arvensis*'in çiçeklerinden asetilkolinesteraz inhibitörü olarak etki gösteren linarin (akasetin-7-O-β-D-rutinozit) bileşiği elde etmişlerdir (Oinonen 2006).

Jian ve arkadaşları tarafından, Çin'de yetişen *M. spicata*'nın toprak üstü kısımlarından iki yeni lignan (spikatolignan A ve B) elde etmişlerdir (Jian 2007).

Olsen ve arkadaşları tarafından, *M. aquatica*'nın etanol ekstresinden monoamin oksidaz inhibitörü olarak etki gösteren naringenin elde etmişlerdir (Olsen 2008).

Al-Bayati ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın uçucu yağından elde edilen (-)-mentolün antimikrobiyal aktivitesi patojenik ve patojenik olmayan 7 mikroorganizmaya (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*) karşı test edildi. Disk difüzyon yönteminde, *P. aeruginosa* hariç test edilen bütün bakterilere karşı aktivite gösteren mentol, en yüksek aktiviteyi *S. mutans*'a karşı gösterdi. *C. albicans*'a karşı da iyi antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Al-Bayati 2009).

Tokhsyrova ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın HPLC ile analizi sonucunda gallik asit, tanen, kafeik asit, ferulik asit, rutin, hesperidin, kumarin, luteolin, kersetin, kamferol ve apigenin içerdiği tespit edilmiştir (Tokhsyrova 2009).

Akroum ve arkadaşları tarafından, *M. longifolia*'nın etanol ekstresinin metanol ekstresine göre antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Etanol ekstresinden elde edilen flavonoidler: luteolin 7-O-glikozit, luteolin 7,3'-O-diglikozit, apigenin, kersetin 3-O-glikozit ve kamferol 3-O-glikozit (Akroum 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmanın materyalini oluşturan bitki örneği Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinden Yrd. Doç. Dr. Abduselam ERTAŞ tarafından Mardin, Kızıltepe, Dikmen beldesi deresi doğu bölgesinden toplanıp Dr. Yeter YEŞİL (İ.Ü. Ecz. Fak. Farmasötik Botanik ABD) tarafından teşhis edildi. HARLEY İSTE NO: 101084

3.1.1. Kullanılan Bitki Türü, Yayılışı ve Kullanım Alanları

Nemli yerlerde yetişen çok yıllık nadiren tek yıllık bitkilerdir. Sürünücü rizomlara sahiptirler. Yapraklar basittir ve karakteristik güzel kokulu epidermal salgı tüyleri taşırlar. Çiçekler hermafrodit veya dişi organ aynı veya ayrı bitki üzerindedir. Kaliks aktinomorf veya sub-bilabiat, tubular veya kampanulat, 10-13 damarlı, 5 subekual veya ekual olmayan dişlidir. Koralla zayıfça iki dudaklı, subekual loblu, üsteki lob daha geniştir, genellikle emarginattır ve tüb kaliksten daha kısadır. Stamenler 4 tanedir, dışa doğru üst dudakların altından yükselir. Meyveler küçük ve pürüzsüz, çukurcuklu, ağımsı veya az pürüzlüdür.

Ülkemizde yetişen *Mentha* (nane) türleri şunlardır:

Mentha aquatica L., *Mentha arvensis* L., *Mentha longifolia* (L.) Hudson, *M. longifolia* L. Hudson subsp. *Longifolia*, *M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley, *M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*. *Typhoides*, *M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*. *calliantha* (Stapf) Briq., *M. longifolia* L. Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq., *Mentha pulegium* L., *Mentha spicata* L., *M. spicata* L. subsp. *spicata* L., *M. spicata* L. subsp. *tomentosa* (Briq.) Harley, *Mentha suaveolens* Ehrh., *Mentha x piperita* L.

Mentha türleri (nane), ülkemizde ve dünyada hem tıbbi amaçla hem de baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde *Mentha piperita* L.'nin yapraklarından hazırlanan infüzyon bulantı kesici, gaz söktürücü ve koku verici olarak, *M. piperita*'nin çiçekli ve yapraklı dallarından elde edilen uçucu yağ koku verici, ferahlatıcı, antiseptik ve bulantı kesici olarak kullanılır.

Çin'de *M. haplocalyx* Briq.'in toprak üstü kısımları sindirim, solunum ve sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde halk arasında yaygın olarak kullanılmalarının yanı sıra gıda olarak da tüketilmektedir. Sudan ve Suudi Arabistan'da ticari olarak yetiştirilen *M. spicata* L. ve *M. longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperi* Briq. antispazmodik, karminatif, midevi ve baharat olarak kullanılmaktadır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Prokainamid (Sigma aldrich), 4-kloro-2-nitro anilin (Fluka), Aseton (Sigma aldrich), Etanol (Sigma aldrich), Dietil eter (Sigma aldrich), Floro borik asit (Fluka), İsoptentil nitrit (Fluka), Agaroz (Sigma), Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma), Bakır (I) klorür (Sigma aldrich), Petrol eteri (Riedel-de Haen), Metanol (Sigma aldrich), Gallik asit (Sigma aldrich), Quercetin (Fluka), Bovine serum albumin (BSA) (Sigma aldrich), Sodyum dodesil sülfat SDS (Sigma aldrich), 2-merkaptto etanol (Fluka), Bromofenol blue (Sigma aldrich), Glisin (Sigma aldrich), Bütillenmiş hidroksi toluen BHT (Sigma aldrich), Etidyum bromür (Amresco), sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) (Sigma aldrich), Hidrojen peroksit (Sigma aldrich), Askorbik asit (Sigma aldrich), Sodyum karbonat (Sigma aldrich), folin&ciocalteu's fenol reaktifi (Merk), Potasyum karbonat (Merk), Alemnium nitrat (Aldrich), Akrilamid/Bis-akrilamid (Sigma), Sodyum hidroksit (Sigma aldrich), Potasyum fosfatbazik (Fluka), Potasyum fosfatmonobazik (Fluka), Amonyum persülfat (Sigma), N,N,N',N'-tetrametiletil enediamin (Sigma), Aseton-D6 (Merck), Dimetilsülfoksit-D6 (Merck) kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Aletler

Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), Yatay DNA elektroforez (Biorad), Dikey SDS-PAGE elektroforez (Biorad) güç kaynağı (Biorad-power PAC 3000), ¹H NMR (Bruker 400 MHz), ¹³C NMR (Bruker 100 MHz), FT-IR (Mattson 1000 FTIR UNICAM Spectrometer), UV-visible, Cary 100 spektrometre (Varian), santrifüj (Universal 320R Hettich), santrifüj (mini spin plus-ependorf), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), otoklav (Hirayama-HV-502), çalkalayıcı (Memmert), terazi, pH metre (Mettler Toledo), çeker ocak, vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell),

blender, -20 derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) cihazları kullanılmıştır.

3.2. Metot

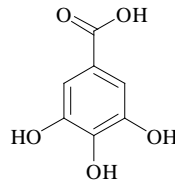
3.2.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteus yöntemine göre belirlendi (Singleton ve ark. 1999). Standart olarak gallik asit kullanıldı (Şekil 3.1). Gallik asitin 1 mg/mL'lik stok çözeltisi metanol içinde hazırlandı. Bu stok çözülden 25, 50, 100, 150, 200, 250, 350 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstaktının 1 mg/mL'lik çözeltisi metanolda, uçucu yağının ise 1 mg/mL'lik çözeltisi petrol eterinde hazırlandı. Daha sonra konsantrasyonlarına göre gallik asitin ekstrakt çözeltisine ve uçucu yağına ayrı ayrı 40 µL eklenip, üzerlerine 1160 µL saf su ve 200 µL 2N folin reaktifinden ilave edilip iyice karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 600 µL %20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldı. Oluşan karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalandı. Bu sürenin sonunda UV'de 765 nm'de absorbans ölçüldü.

Galik asidin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0024 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g}) \quad (R^2=0.9967) \quad (1)$$

Eşitlik (1) kullanılarak *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer (GAE) olarak hesaplandı.



Şekil 3.1. Gallik asit

3.2.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

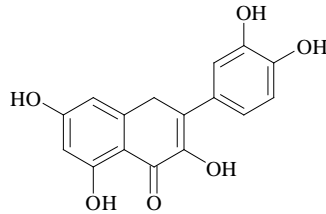
M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının toplam flavonoid bileşen tayini Zhishen ve ark. (1999) tarafından tanımlanan yöntem ile tayin edildi. Standart olarak quercetin kullanıldı (Şekil 3.2). Bu yöntemin dayandığı temel prensip quercetin içindeki flavonoid bileşen miktarını quercetin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktı ve uçucu yağının içindeki toplam flavonoid bileşen miktarını quercetine eşdeğer olarak hesaplamaktır.

Quercetin metanol içindeki 100 µg/mL'lik stok çözeltisinden 1, 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/mL'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının 1 mg/mL'lik çözeltisi etanolde, uçucu yağının 1 mg/mL'lik çözeltisi ise petrol eterinde hazırlandı. Daha sonra deney ortamına 0.1 ml % 10'luk $Al(NO_3)_3$, 0.1 mL 1M CH_3COOK ve 3.8 mL metanol bırakıldı. Bu karışım üzerine konsantrasyonlarına göre 1 mL quercetine karşı 1 mL ekstrakt ve 1 mL uçucu yağ ayrı ayrı kendi deney tüplerine eklenip karışım iyice karıştırıldı. Sonra elde edilen son karışım 25 °C'deki su banyosunda 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV'de 415 nm'de absorbans ölçüldü.

Quercetin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.028 \times \text{quercetin } (\mu\text{g}) \quad (R^2 = 0.9999) \quad (2)$$

Eşitlik (2) kullanılarak *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer (QUE) olarak hesaplandı.



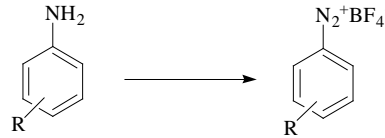
Şekil 3.2. Quercetin

3.2.3. Diazonyum Tuzlarının Hazırlanması

Antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid ilacı yapısında aromatik halkaya bağlı amin grubu bulundurmaktadır. Bu ilacın MPO/H₂O₂ metabolizması varlığında, biyoaktivasyonu sonucu oluşan reaktif metabolitlerinin başta proteinler olmak üzere hücrenin diğer biyolojik makromoleküller üzerinde hasara neden olması, bizi bir model olarak aromatik halkaya bağlı amin grubuna sahip 4-kloro-2-nitro anilin molekülünün diazonyum tuzunu sentezleyip, bunun protein oksidasyonu ve DNA üzerinde meydana getirdiği hasarları incelemeye yöneltti. Daha sonra bu model örnek alınarak, prokainamid ilacında diazonyum tuzu sentezlendi.

Genelde diazonyum tuzları klor tuzları olarak hazırlanırlar, fakat tetrafloroborat tuzları, klor tuzlarına oranla daha kararlı olduğu için bu çalışmada diazonyum tuzları tetrafloroborat tuzu olarak sentezlendi (Şekil 3.3).

4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ve prokainamid tetrafloroborat bilinen yöntemlerle sentezlendi.

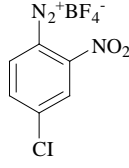


Kullanılan kimyasallar ve koşullar

İsoamil nitrit, HBF₄ (aq.), EtOH, 0 °C, 30 dakika

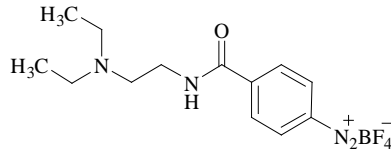
Şekil 3.3. Diazonyum tuzlarının sentezi

3.2.4. 4-Kloro-2-nitro benzendiazonyum tetrafloroborat



4-kloro-2-nitroanilin (0.25 g, 1.44 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.27 mL, 0.37g, 4.32 mmol, 3.0 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.22 mL, 0.20 g, 1.72 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat beyaz katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilip yeniden kristallendirilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm)= 9.32 (d, J= 8.8 Hz, 1H C₃), 9.05 (d, J= 2.0 Hz, 1H C₅), 8.65 (dd, J= 4.0Hz, 1H C₆), ¹³C NMR (CD₃OD): δ (ppm)= 149.47 (CNO₂), 138.03 (CCl), 137.76 (CN₂⁺BF₄⁻), 136.78 (C₅), 128.98 (C₆), 128.80 (C₃), IR (KBr)/cm⁻¹ 3444, 3107, 2717, 1557, 1347, 1159, 1083, 1051, 890, 848, 786.

3.2.5. Prokainamid tetrafloroborat



Procainamide hydrochloride (0.5 g, 1.83 mmol, 1.0 eq) etanol (1 mL) içinde çözüldü. Üzerine sulu floro borik asit (%48'lik çözelti; 0.35 mL, 0.48 g, 5.49 mmol, 3 eq) ilave edildi ve karışım -5 °C'ye soğutuldu. Karışıma isoamil nitrit (0.29 mL, 0,25 g, 2.19 mmol, 1.2 eq) damla damla ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Dietil eter (30 mL) ilavesiyle procainamide tetrafloroborat beyaz katı olarak çöktürüldü. Çöktürülen katı süzülerek az miktarda soğuk asetonda (~1 mL) çözülüp, soğuk eter (30 mL) ilave edilip yeniden kristallendirilerek beyaz kristaller halinde saflaştırıldı. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm)= 8.93 (d, J= 8.88 Hz, 2H C₂, C₆), 8.52 (d, J= 8.88 Hz, 2H C₃,

C₅), 3.94 (t, $J= 5.76$ Hz, 2H NHCH₂CH₂), 3.60 (t, $J= 5.6$ Hz, 2H NHCH₂CH₂N), 3.44 (q, $J= 7.0$ Hz, 4H NCH₂CH₃), 1.21 (t, $J= 7.2$ Hz, 6H NCH₂CH₃), ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm)= 212.12 (C=O), 169.36 (C₅), 149.03 (C₃), 138.09 (C₆), 134.97 (C₂), 123.39 (C₄) 54.64 (NHCH₂CH₂), 51.74 (NHCH₂CH₂), 39.74 (CN₂⁺BF₄⁻), 35.85 (CH₂CH₃), 13.45 (CH₃), IR (KBr)/cm⁻¹ 3600, 3399, 3318, 3042, 2984, 2944, 2914, 2666, 1668, 1542, 1301, 1066, 859, 759.

3.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, DNA ve RNA gibi biyolojik makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler temelinde ayırmak için kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforezi tekniği, önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır. Elektroferez terimi yüklü partiküllerin elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır. Elektroferez için gerekli güç, jelin iki ucunda bulunan elektrotlara uygulanan voltajdır. Bir elektrik alanının bir molekülü hangi hızla jel ortamında hareket ettirdiği, molekülün özelliklerine bağlıdır.

Birçok önemli biyolojik makromolekül (amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak çözüldüde katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak yüklü partiküller katoda veya anoda doğru hareket ederler. Elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da ise DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anottan katoda doğru hareket eder.

3.3.1.1. Agaroz Jel'in Hazırlanması

Agaroz (1 g) 100 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. 60 °C'ye soğutuldu. 1.5 μ L etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletildi.

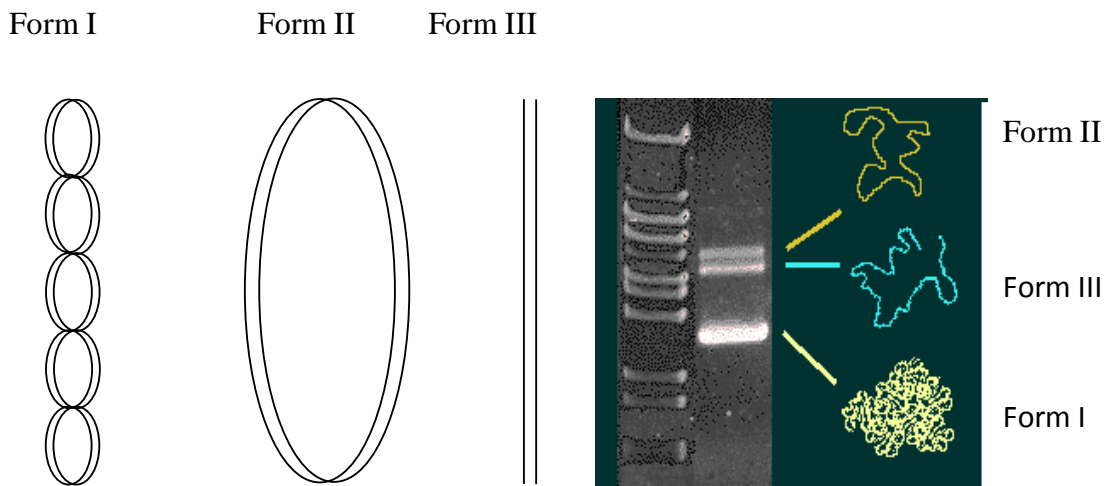
3.3.1.2. Agaroz Jel Elektrofrez Yapılması

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 mL Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektrofrez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektrofrez 120 V'ta 500 mA akım uygulanarak 80 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı çekildi.

3.3.1.3. Plazmid Saflaştırma

DNA kesiminin incelemenin bir yolu supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I); open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) veya linear (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) forma dönüşümünü incelemektir. Agaroz Jel Elektrofrezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir. (Şekil 3.4)

Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) TENS yöntemi ve Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı.



Şekil 3.4. Plazmid DNA'nın formları

3.3.1.4. TENS Yöntemi

37 °C'de Ampisilinli Luria Bertani (2.5g Tripton, 1.25 g yeast extract, 2.5 g sodyum klorür, 0.025 g ampisilin, 250 mL saf su) sıvı besiyerinde üretilen bakteri kültüründen 20 tane Eppendorf tüpe 1'er mL alındı. 12500 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi, üst sıvılar uzaklaştırıldı. Her bir tüpe 300 µL TENS çözeltisi (100 mL'de: 10 mL 0.1 M TrisCl pH 7.5; 0.5 M 200 µL EDTA pH 8.0; 0.4 g NaCl; 1,5 g NaOH) eklendi ve ters düz edildi. 150 µL sodyum asetat çözeltisi (3 M pH 5.2) eklendi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 2 dakika 12500 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı, üzerine 1 mL soğuk mutlak etil alkol ilave edildi. -20 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Etil alkol uzaklaştırıldı, pellet % 70'lik etil alkol ile yıkandı. 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra alkol uzaklaştırıldı. Etüvde 37 °C'de alkolün kalan kısmı uzaklaştırıldı ve 20 TE tamponu ilave edildi. Her tüpet konsantrasyon 20 µg/mL olacak şekilde ribonükleaz çözeltisi ilave edildi.

3.3.1.5. Mini Prep

pBluescript M13+ plazmid DNA'sı Qiagene plazmid kiti kullanılarak saflaştırıldı. 96 pBluescript M13+ plazmid DNA'nın saflığına, hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı (50 µg/mL için A₂₆₀=1.0).

3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Fenil radikalinin meydana getirdiği protein oksidasyonu üzerine *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının ve uçucu yağının koruyucu etkisi elektroforetik olarak SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi incelendi. Bu metotta protein olarak bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. Bitki ekstraktının ve uçucu yağının 7.5 mg/mL'lik konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 100, 500, 1000 ve 1500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. BSA 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7.4) içinde çözüldü. Deney tüpüne sırasıyla potasyum fosfat tamponu (pH=7.4), ekstrakt/uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı seyreltik çözeltileri, 200 µL BSA, 200 µL 1.5 mM CuCl₂, 200 µL, 3.1 mM PhN₂⁺ ilave edildi. Toplam hacmi

3. MATERYAL VE METOT

1 mL olan karışım oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilmiş reaksiyon karışımı Laemli's (1970) metodu kullanılarak %10'luk sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) içinde elektroforezle analiz edildi. Örnekler tamponla (Tris HCl pH=6.8, %2 SDS, %5 2-merkapt etanol, %10 sükröz ve %0.002 bromofenol blue) eşit hacimde karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 5 dakika 100 °C'de ısıtıldı. Bu süre sonunda her bir örnekten 5 µL elektroforez kuyucuklarına yüklendi. Jel BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak minijel için 25 mAmp sabit bir değer ve maximum voltajda yürütücü tamponla (Tris HCl pH=6.8, %2 SDS, %5 2-merkapt etanol, %10 sükröz ve %0.002 bromofenol blue) BioRad tankında yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller %15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 1 saat süreyle renklendirildikten sonra boya çıkarma solüsyonu (su:metanol:glasiyel asetik asit: 6:3:21 v:v:v) ile jellerden boya çıkarıldı. Daha sonra bu jeller jel görüntüleme sistemiyle dijital olarak fotoğraflandırdı.

3.4.1. Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması

Protein hasarının miktarını ve band yoğunluğunu belirleme jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantlar Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grubla standardize edildi. Sonuçlar 3 farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

3.5. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *M. longifolia* bitkisinin tüm kısımları blender aracılığıyla toz haline getirilip 16 g tartıldı. Soxhlet düzeneği kuruldu. 500 ml metanol ile 6 saat soxhlet edildi. 6 saat sonunda metanol evaporatör ile uçuruldu. 4.32 g koyu yeşil metanol ekstraktı elde edildi.

3.5.1. Uçucu Yağ Eldesi

M. longifolia bitkisinin tüm kısımları blender aracılığıyla toz haline getirilip 50 g tartıldı. Clavenger düzeneği kuruldu. Yaklaşık 3 saat sonra oluşan uçucu yağlar, pipet yardımıyla alındı. 0.259 g açık sarı uçucu yağ elde edildi.

3.5.2. Stok Diazonyum Tuzu Çözeltisinin Hazırlanması

4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ve prokainamid tetrafloroborat tuzunun çözeltisi su içerisinde 1.5 mM olacak şekilde 50 mL hazırlandı.

3.5.3. Stok Elektron Donör Çözeltisinin Hazırlanması

Bakır (I) klorür çözeltisi su içerisinde 3.1 mM olacak şekilde 50 mL hazırlandı.

3.5.4. Stok Uçucu Yağ Çözeltisinin Hazırlanması

M. longifolia bitkisinin uçucu yağının stok çözeltisi petrol eteri içinde 25 mg/mL olacak şekilde 1 mL hazırlandı.

3.5.5. Stok Bitki Ekstraktı Çözeltisinin Hazırlanması

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının stok çözeltisi %70'lik metanol içinde 5 mg/mL olacak şekilde 1 mL hazırlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Gallik asidin 1.0 mg/mL'lik stok çözeltisinden 25-500 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorban değerleri 765 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen bu absorban değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0012 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktının ve uçucu yağının 1 mg'larının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarları gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı.

M. longifolia'nın metanol ekstraktının 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 147.59 ± 1.15 µg gallik asite, uçucu yağının 1 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı ise 4.98 ± 0.52 µg gallik aside eşdeğer olduğu bulundu (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarı

Toplam Fenolik Bileşen	
Ekstrakt/Uçucu Yağ	Gallik asit eşdeğeri (µg GAE/mg ekstrakt)
<i>M. longifolia</i> - Metanol	147.59 ± 1.15
<i>M. longifolia</i> - Uçucu Yağ	4.98 ± 0.52

4.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer olarak hesaplandı. Quercetin'in 1mg/mL'lik stok çözeltisinden 1-25 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorbans değerleri 415 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen bu absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.028 \times \text{quercetin } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktının ve uçucu yağının 1 mg'larının içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarları quercetine eşdeğer olarak hesaplandı.

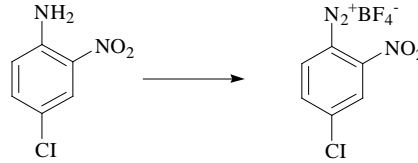
M. longifolia'nın metanol ekstraktının 1 mg'nın içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı 16.12 ± 0.38 µg quercetine, uçucu yağının 1 mg'nın içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı ise 1.84 ± 0.032 µg quercetine eşdeğer olduğu bulundu (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarı

Toplam Flavonoid Bileşen	
Ekstrakt/Uçucu Yağ	Quercetin Eşdeğeri (µg QUE/mg ekstrakt)
<i>M. longifolia</i> - Metanol	16.12 ± 0.38
<i>M. longifolia</i> - Uçucu Yağ	1.84 ± 0.032

4.3. 4-Kloro-2-nitro Benzendiazonyum Tetrafloroborat Sentezi

4-kloro-2-nitro tetrafloroborat bilinen yöntemlerle sentezlendi (Çeken ve Kızıl 2007).

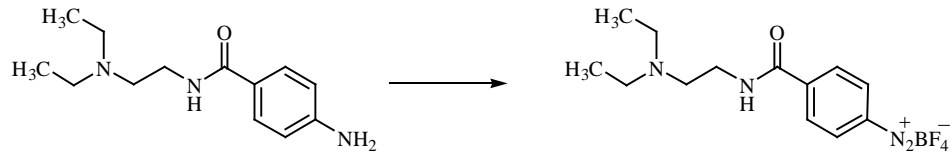


Kullanılan kimyasallar ve koşullar

İsoamil nitrit, HBF₄ (aq.), EtOH, 0 °C, 30 dakika

4.4. Prokainamid Tetrafloroborat Sentezi

Prokainamid tetrafloroborat bilinen yöntemlerle sentezlendi (Çeken ve Kızıl 2007).



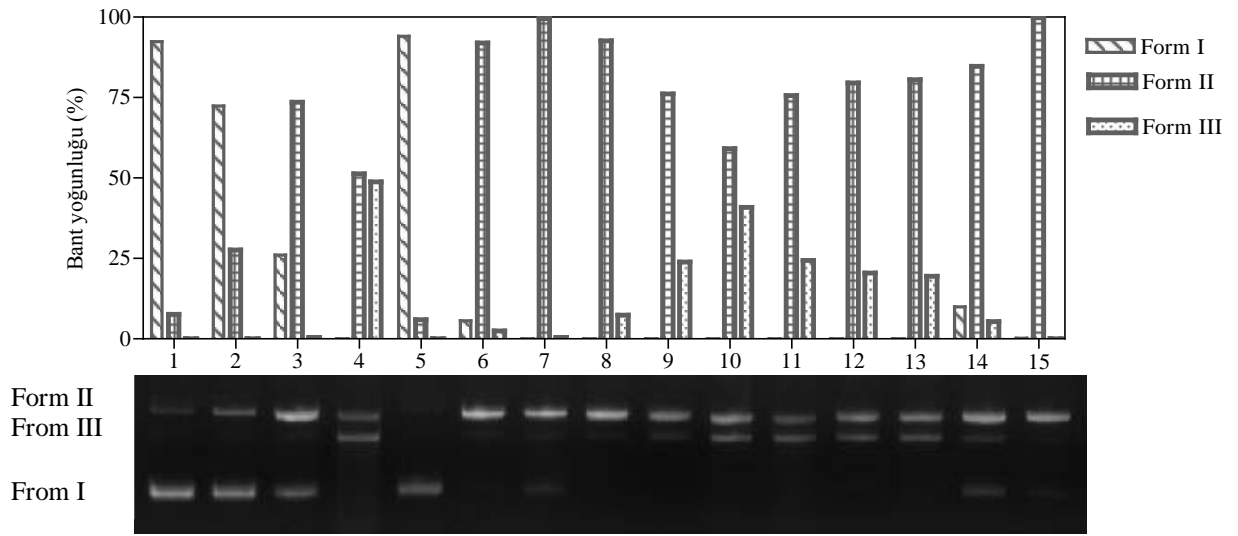
Kullanılan kimyasallar ve koşullar

İsoamil nitrit, HBF₄ (aq.), EtOH, 0 °C, 30 dakika

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

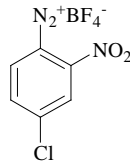
Bu çalışmada aromatik amin bazlı ilaçların insanlarda myeloperoksidaz (MPO) ve H₂O₂ varlığında biyoaktivasyonları sonucu oluşan reaktif metabolitlerinin (aril radikali) başta proteinler olmak üzere, diğer biyolojik makromoleküller üzerinde hasar oluşturduğu rapor edilmiştir. Yapılan model çalışmada, 4-kloro-2-nitro anilinin sentezlenen diazonyum tuzunun elektron donör varlığında oluşturduğu aril radikallerinin, DNA ve protein üzerine olan hasarı ve *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının bu hasarı önleme etkisi çalışıldı.

Aşağıdaki reaksiyonlar 0.5 mL Eppendorf tüp içerisinde karanlıkta gerçekleştirildi. Tüm tüpler alüminyum folyo ile sarıldı ve reaksiyon oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. Bütün tüplere 200 ng pBluescript M13+ plazmid DNA (3.2 kb) konuldu. Bakır (I) klorür 1 µL (1.03 mM), diazonyum tuzu 2 µL (3.1 mM), β-merkapt etanol 1µL (10 mg/mL), etanol 1µL (10 mg/mL) kullanıldı.



Fotoğraf 4.1. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (1) varlığında, karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (1); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **5. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **6. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **8. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **9. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **10. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **11. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **12. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **13. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **14. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **15. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

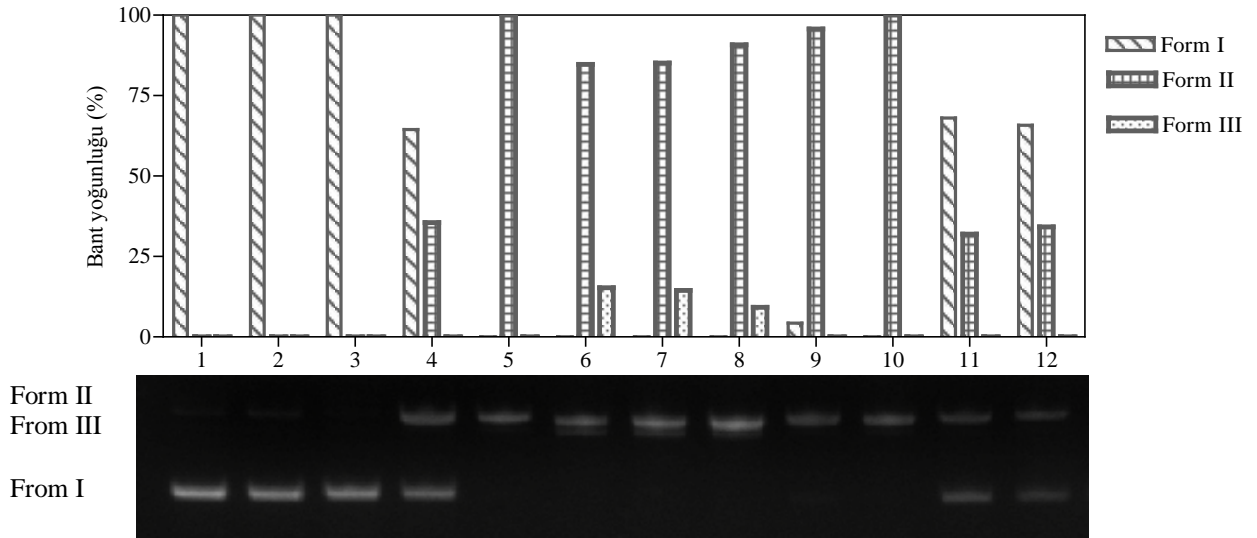


(1)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	92,39	7,61	
2	DNA+CuCl	75,41	27,59	
3	DNA+PhN ₂ ⁺	26,00	73,55	0,46
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺		51,25	48,75
5	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)	91,05	8,95	
6	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+CuCl	5,59	91,98	2,44
7	DNA+ <i>M. longifolia</i> (50 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		99,58	0,42
8	DNA+ <i>M. longifolia</i> (100 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		92,66	7,34
9	DNA+ <i>M. longifolia</i> (250 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		76,13	23,87
10	DNA+ <i>M. longifolia</i> (500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		59,13	40,87
11	DNA+ <i>M. longifolia</i> (750 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		75,60	24,40
12	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		79,56	20,44
13	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		80,53	19,47
14	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	9,99	84,67	5,34
15	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	0,19	99,81	

Tablo 4.3. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



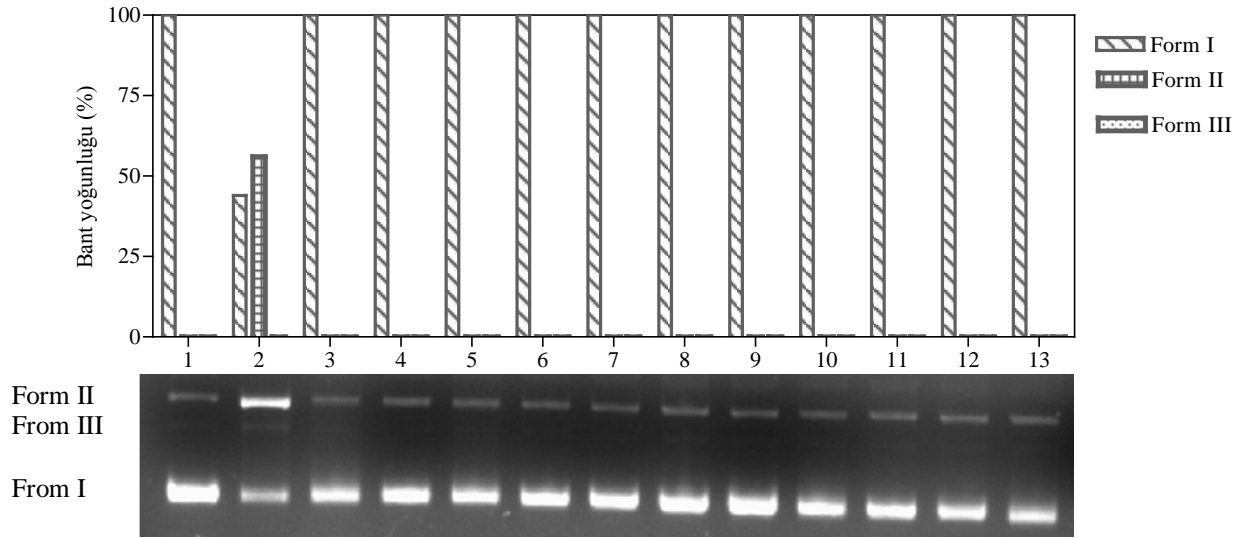
Fotoğraf 4.2. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 µg/mL); **4. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (50 µg/mL) + bakır (I) klorür; **5. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + bakır (I) klorür; **6. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (250 µg/mL) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + bakır (I) klorür; **8. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (750 µg/mL) + bakır (I) klorür; **9. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür; **10. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür **11. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2000 µg/mL) + bakır (I) klorür; **12. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2500 µg/mL) + bakır (I) klorür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+CuCl	100		
3	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)	100		
4	DNA+ <i>M. longifolia</i> (50 µg/mL)+CuCl	64,45	35,55	
5	DNA+ <i>M. longifolia</i> (100 µg/mL)+CuCl		100	
6	DNA+ <i>M. longifolia</i> (250 µg/mL)+CuCl		84,73	15,27
7	DNA+ <i>M. longifolia</i> (500 µg/mL)+CuCl		85,14	14,44
8	DNA+ <i>M. longifolia</i> (750 µg/mL)+CuCl		90,82	9,18
9	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+CuCl	4,31	95,69	
10	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1500 µg/mL)+CuCl		100	
11	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2000 µg/mL)+CuCl	68,05	31,95	
12	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2500 µg/mL)+CuCl	65,77	34,23	

Tablo 4.4. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



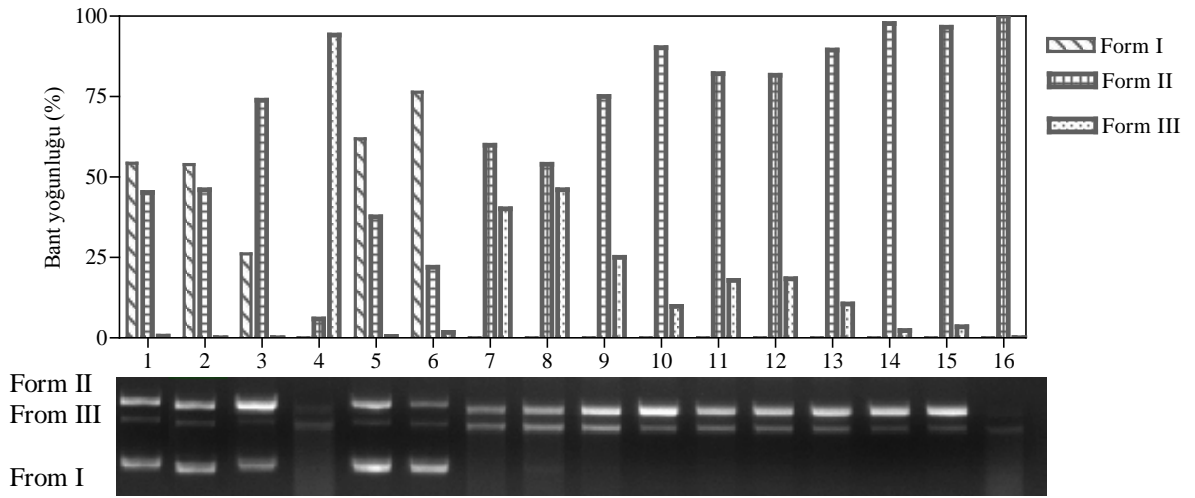
Fotoğraf 4.3. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, diazonyum tuzu (1) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (1); **3. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **4. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **5. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **6. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **7. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **8. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **9. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **10. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **11. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **12. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (1); **13. kuyucuk**, DNA + metanol + PhN_2^+ (1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+PhN ₂ ⁺	43,99	56,01	
3	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)	100		
4	DNA+ <i>M. longifolia</i> (50 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
5	DNA+ <i>M. longifolia</i> (100 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
6	DNA+ <i>M. longifolia</i> (250 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
7	DNA+ <i>M. longifolia</i> (500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
8	DNA+ <i>M. longifolia</i> (750 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
9	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
10	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
11	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
12	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	100		
13	DNA+Metanol+ PhN ₂ ⁺	100		

Tablo 4.5. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının diazonyum tuzu (1) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



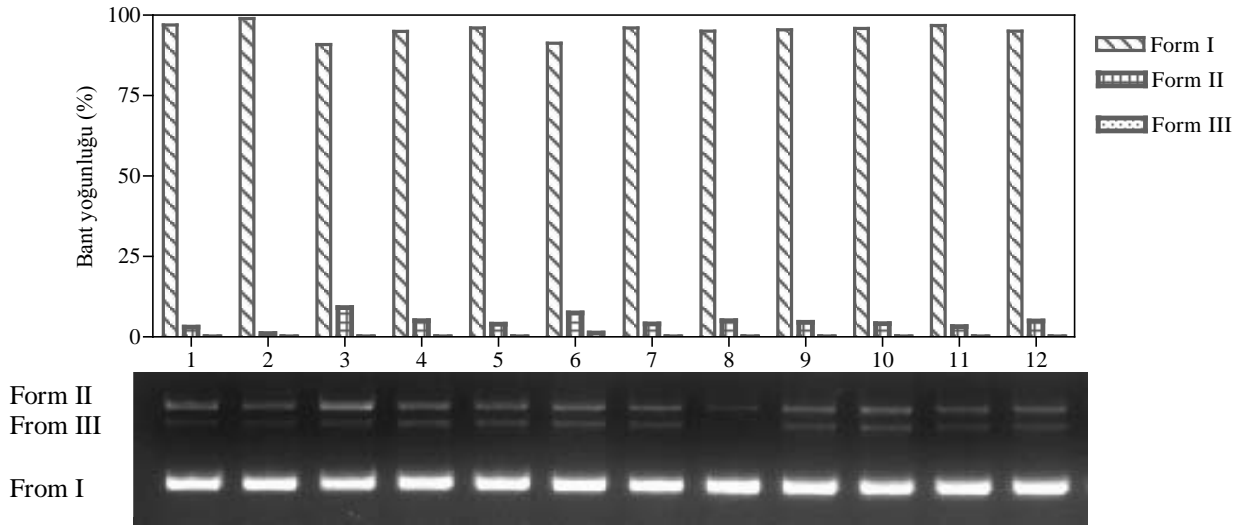
Fotoğraf 4.4. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (1) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (1); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **5. kuyucuk**, DNA + UY (3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **6. kuyucuk**, DNA + UY (3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, DNA + UY (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **8. kuyucuk**, DNA + UY (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **9. kuyucuk**, DNA + UY (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **10. kuyucuk**, DNA + UY (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **11. kuyucuk**, DNA + UY (3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **12. kuyucuk**, DNA + UY (3500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **13. kuyucuk**, DNA + UY (4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **14. kuyucuk**, DNA + UY (4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **15. kuyucuk**, DNA + UY (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **16. kuyucuk**, DNA + petrol eteri + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	54,31	45,20	0,50
2	DNA+CuCl	53,90	46,01	
3	DNA+PhN ₂ ⁺	26,11	73,89	
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺		5,85	94,15
5	DNA+UY (3000 µg/mL)	61,86	37,65	0,49
6	DNA+UY (3000 µg/mL)+CuCl	76,35	21,98	1,67
7	DNA+UY (1000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		59,88	40,12
8	DNA+UY (1500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		53,92	46,08
9	DNA+UY (2000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		75,00	25,00
10	DNA+UY (2500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		90,20	9,80
11	DNA+UY (3000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		82,13	17,87
12	DNA+UY (3500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		81,63	18,37
13	DNA+UY (4000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		89,48	10,52
14	DNA+UY (4500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		97,23	0,27
15	DNA+UY (5000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		96,55	3,45
16	DNA+Petrol eteri+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	

Tablo 4.6. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



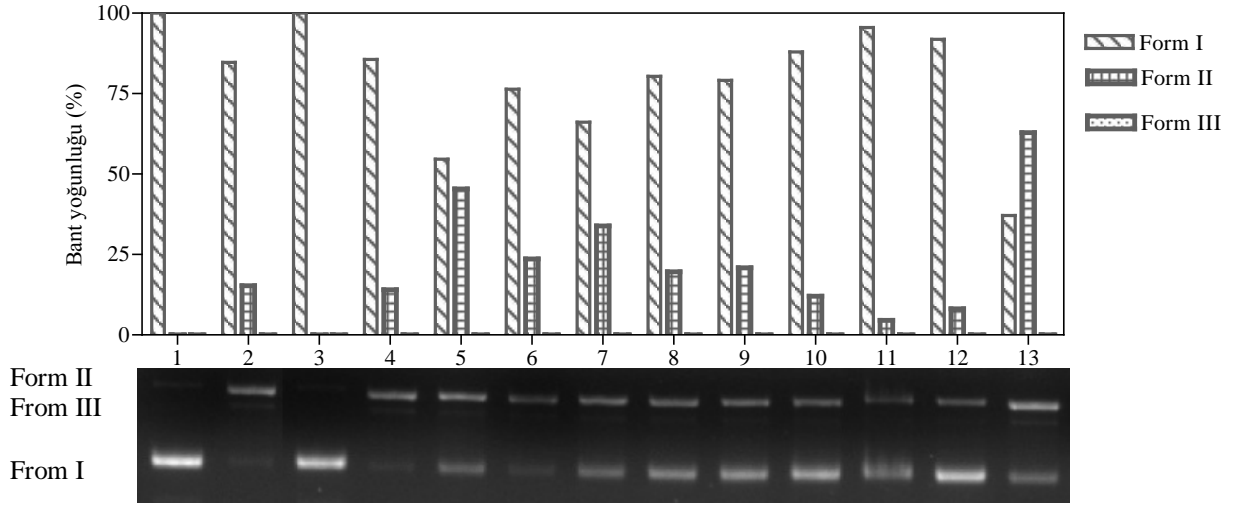
Fotoğraf 4.5. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + UY (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **4. kuyucuk**, DNA + UY (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **5. kuyucuk**, DNA + UY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **6. kuyucuk**, DNA + UY (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, DNA + UY (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **8. kuyucuk**, DNA + UY (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **9. kuyucuk**, DNA + UY (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **10. kuyucuk**, DNA + UY (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **11. kuyucuk**, DNA + UY (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür; **12. kuyucuk**, DNA + UY (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	96,96	3,04	
2	DNA+CuCl	98,95	1,05	
3	DNA+UY (1000 µg/mL)	90,86	9,14	
4	DNA+UY (50 µg/mL)+CuCl	94,99	5,01	
5	DNA+UY (100 µg/mL)+CuCl	96,01	3,99	
6	DNA+UY (250 µg/mL)+CuCl	91,31	7,46	1,23
7	DNA+UY (500 µg/mL)+CuCl	96,00	4,00	
8	DNA+UY (750 µg/mL)+CuCl	95,00	5,00	
9	DNA+UY (1000 µg/mL)+CuCl	95,43	4,57	
10	DNA+UY (1500 µg/mL)+CuCl	95,91	4,09	
11	DNA+UY (2000 µg/mL)+CuCl	96,81	3,19	
12	DNA+UY (2500 µg/mL)+CuCl	94,05	4,95	

Tablo 4.7. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



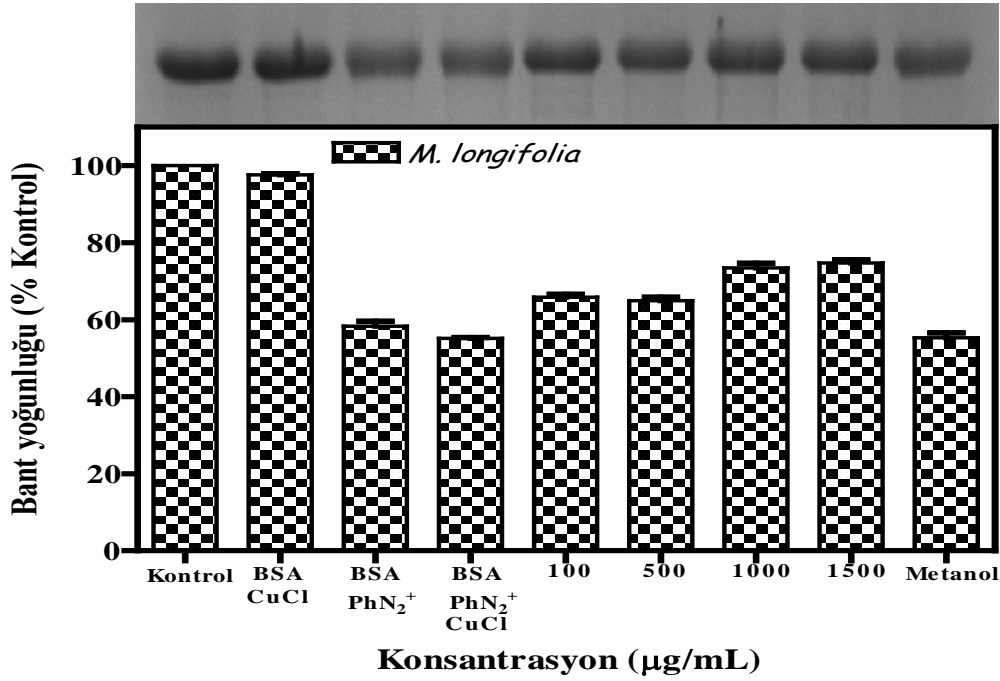
Fotoğraf 4.6. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (1) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + PhN₂⁺ (1); **3. kuyucuk**, DNA + UY (1000 µg/mL); **4. kuyucuk**, DNA + UY (50 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **5. kuyucuk**, DNA + UY (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, DNA + UY (250 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **7. kuyucuk**, DNA + UY (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **8. kuyucuk**, DNA + UY (750 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **9. kuyucuk**, DNA + UY (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **10. kuyucuk**, DNA + UY (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **11. kuyucuk**, DNA + UY (2000 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **12. kuyucuk**, DNA + UY (2500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **13. kuyucuk**, DNA + petrol eteri + PhN₂⁺ (1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

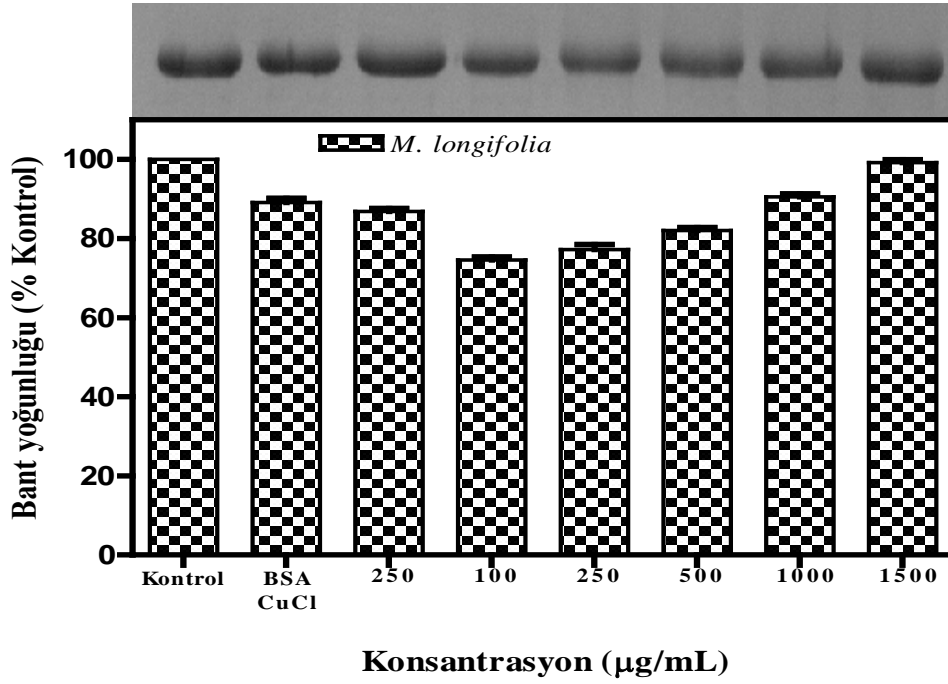
Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+PhN ₂ ⁺	84,67	15,33	
3	DNA+UY (1000 µg/mL)	100		
4	DNA+UY (50 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	85,60	14,04	
5	DNA+UY (100 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	54,61	45,39	
6	DNA+UY (250 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	76,38	23,62	
7	DNA+UY (500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	66,16	33,84	
8	DNA+UY (750 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	80,37	19,63	
9	DNA+UY (1000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	79,12	20,88	
10	DNA+UY (1500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	87,92	12,08	
11	DNA+UY (2000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	95,50	4,50	
12	DNA+UY (2500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	91,85	8,15	
13	DNA+Petrol eteri+PhN ₂ ⁺	62,90	62,90	

Tablo 4.8. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (1) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

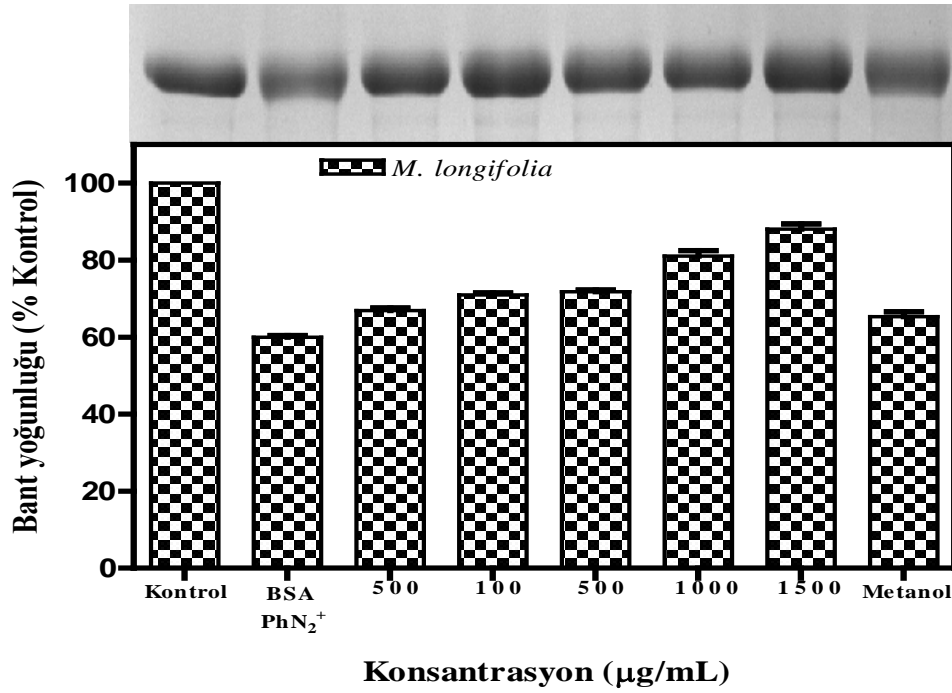
*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



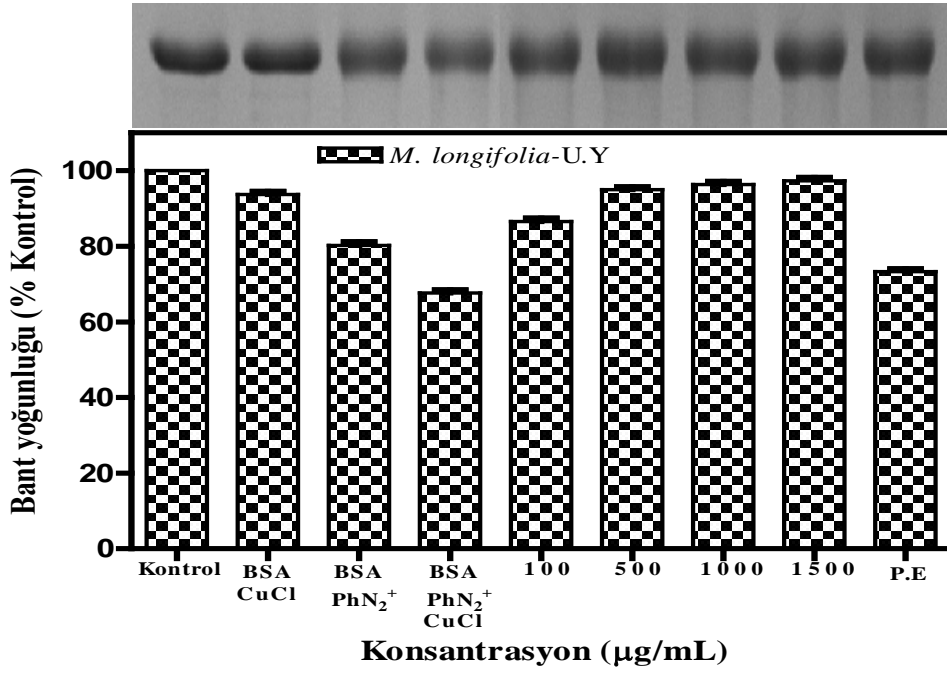
Fotoğraf 4.7. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif Bovine serum albumin (BSA) hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (1) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **5. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **7. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **8. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **9. kuyucuk**, BSA + metanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1).



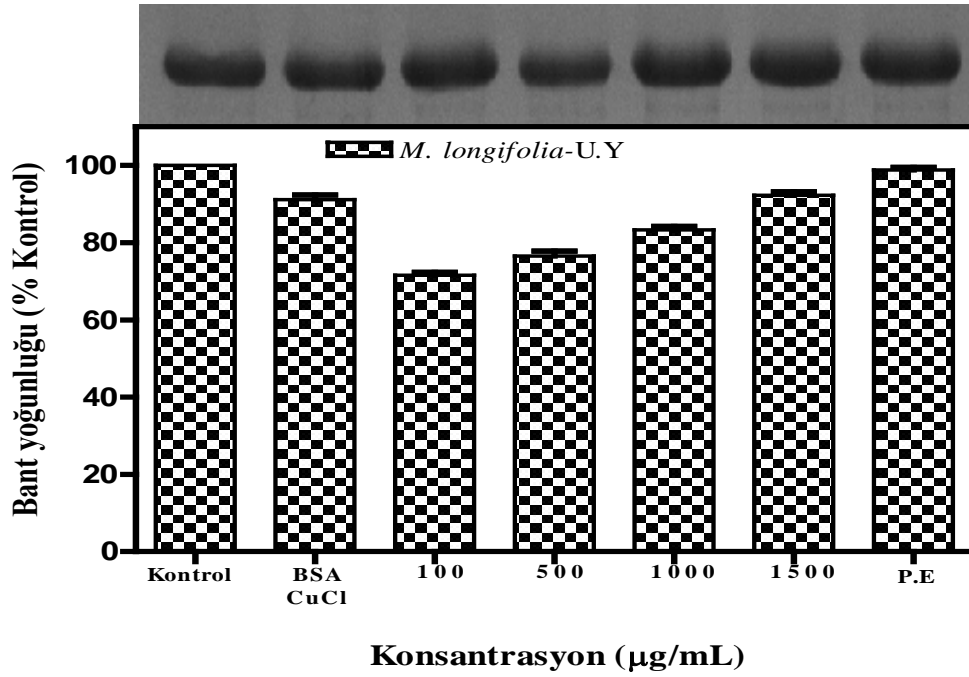
Fotoğraf 4.8. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (250 µg/mL); **4. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + bakır (I) klorür; **5. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (250 µg/mL) + bakır (I) klorür; **6. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür; **8. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür.



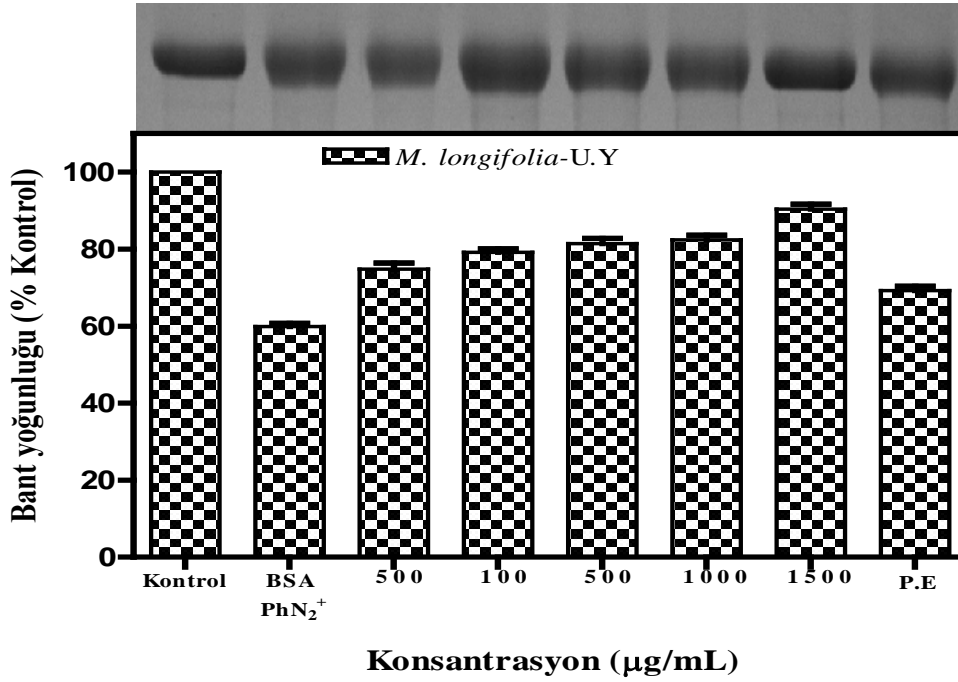
Fotoğraf 4.9. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, diazonyum tuzu (1) varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **3. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL); **4. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (1) ; **5. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **7. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **8. kuyucuk**, BSA + metanol + PhN₂⁺ (1).



Fotoğraf 4.10. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu BSA hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (1) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **5. kuyucuk**, BSA + UY (100 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **7. kuyucuk**, BSA + UY (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **8. kuyucuk**, BSA + UY (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **9. kuyucuk**, BSA + petrol eteri + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1).

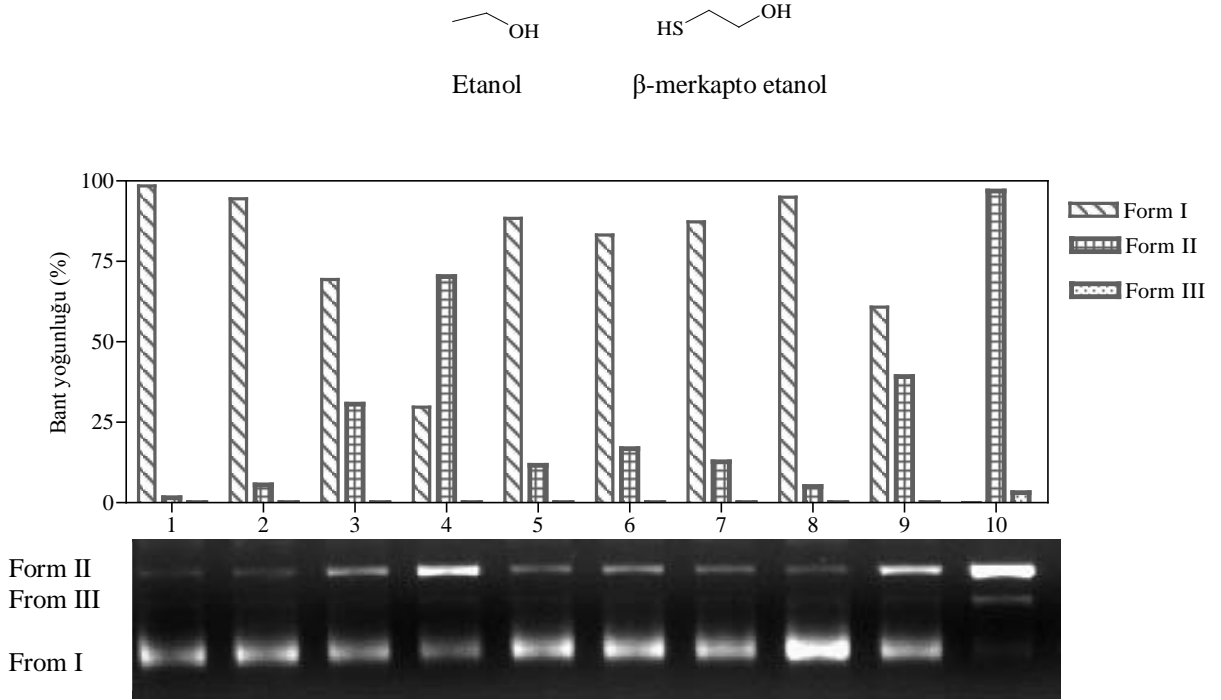


Fotoğraf 4.11. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + UY (100 µg/mL) + bakır (I) klorür; **4. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL) + bakır (I) klorür; **5. kuyucuk**, BSA + UY (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür; **6. kuyucuk**, BSA + UY (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür; **7. kuyucuk**, BSA + petrol eteri + bakır (I) klorür.



Fotoğraf 4.12. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (1) varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **3. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL); **4. kuyucuk**, BSA + UY (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **5. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, BSA + UY (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **7. kuyucuk**, BSA + UY (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (1); **8. kuyucuk**, BSA + petrol eteri + PhN₂⁺ (1).

4-kloro-2-nitro tetrafloroborat molekülünün bakır (I) klorür varlığında, aril radikali oluşturduğu, bu radikallerin DNA ve protein üzerinde hasara neden olduğu görüldü. Bu hasarın aril radikali tarafından olup olmadığının anlaşılabilmesi için mekanistik açıdan aril radikali söndürücü etkisi olduğu bilinen etanol ve β -merkaptto etanol varlığında DNA ve protein üzerine olan etkisi incelendi.



Fotoğraf 4.13. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (1) ile kesim reaksiyonunun etanol ve β -merkaptto etanol varlığında koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (1); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **5. kuyucuk**, DNA + β -merkaptto etanol; **6. kuyucuk**, DNA + β -merkaptto etanol + PhN_2^+ (1); **7. kuyucuk**, DNA + β -merkaptto etanol + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1); **8. kuyucuk**, DNA + etanol; **9. kuyucuk**, DNA + etanol + PhN_2^+ (1); **10. kuyucuk**, DNA + etanol + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1).

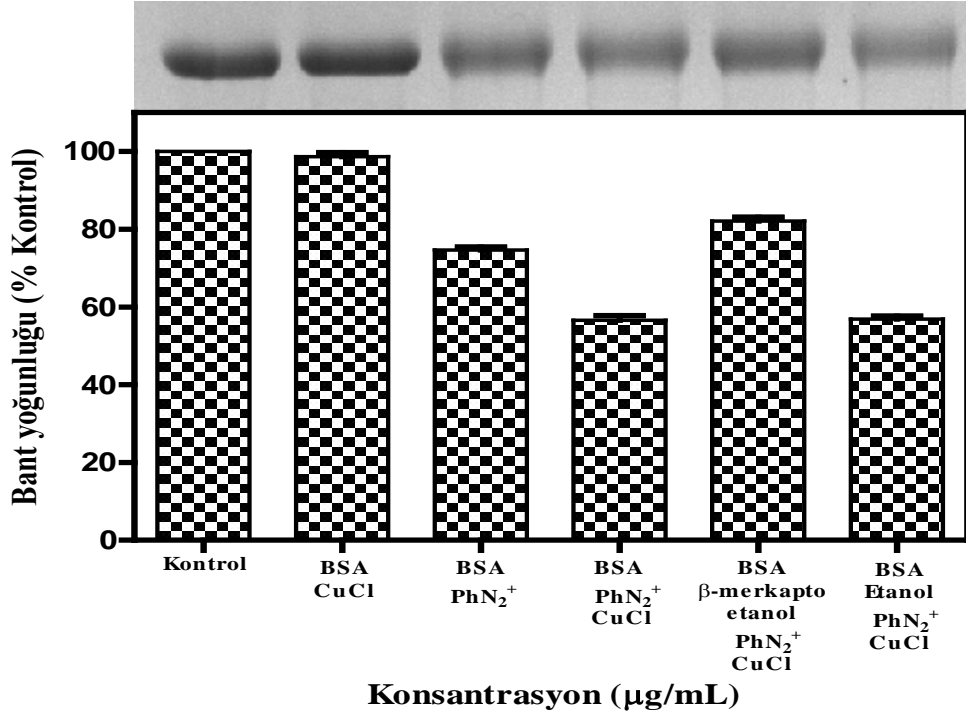
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	98,45	1,55	
2	DNA+CuCl	94,43	5,57	
3	DNA+PhN ₂ ⁺	69,35	30,65	
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺	29,73	70,27	
5	DNA+β-merkaptto etanol	88,35	11,65	
6	DNA+β-merkaptto etanol+PhN ₂ ⁺	83,22	16,78	
7	DNA+β-merkaptto etanol+PhN ₂ ⁺ +CuCl	87,30	12,70	
8	DNA+Etanol	94,98	5,02	
9	DNA+Etanol+PhN ₂ ⁺	60,79	39,21	
10	DNA+Etanol+PhN ₂ ⁺ +CuCl		96,87	3,13

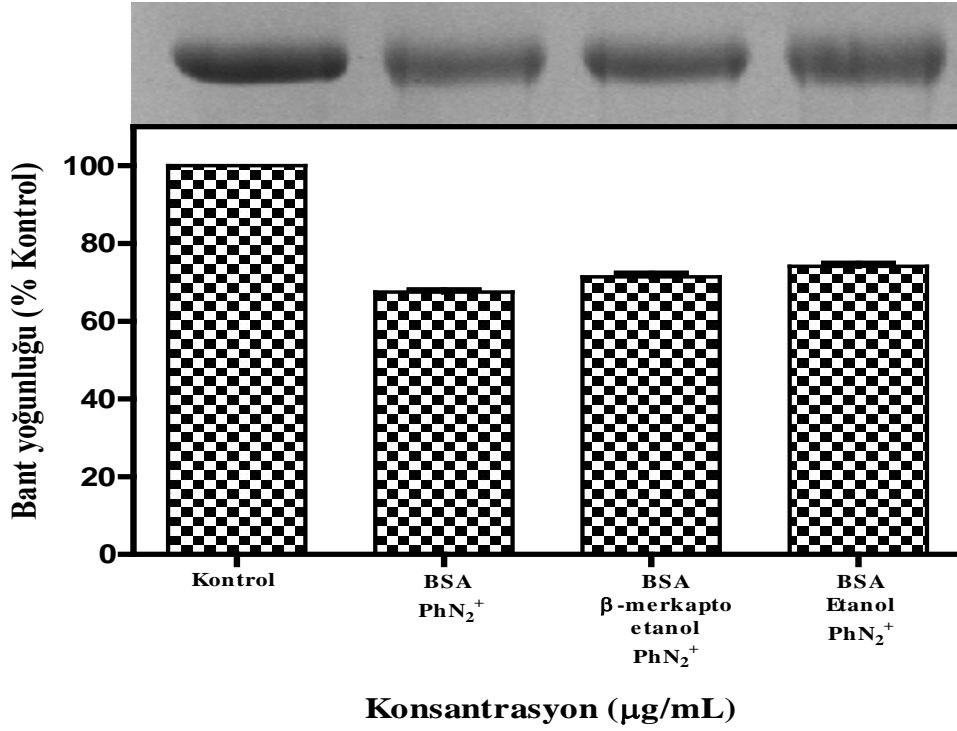
Tablo 4.9. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (1) ile etanol ve β-merkaptto etanolün etkisinin incelenmesi

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

Fotoğraf 4.13 ve tablo 4.9'dan da anlaşıldığı gibi karbon merkezli radikalleri söndürme kapasitesi olduğu bilinen etanol ve β-merkaptto etanol varlığında 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat'ın DNA kesimi β-merkaptto etanol varlığında ~%48 ve bunlara ek olarak bakır (I) klorürün varlığında DNA kesimi ~%73 oranında azalmıştır. Etanol'de ise bir önlemenin olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçtan dolayı daha sonra yapılacak deneylerde karbon merkezli radikalleri söndürmek amacıyla β-merkaptto etanol kullanılmasına karar verildi.

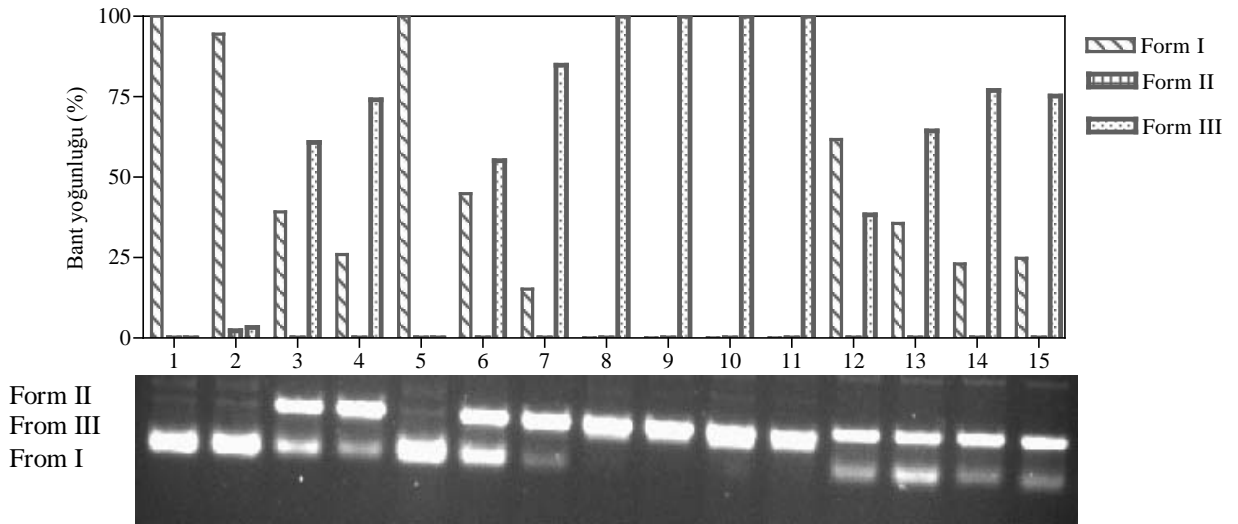


Fotoğraf 4.14. Bovine serum albumin (BSA)'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (1) kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β-merkaptto etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **5. kuyucuk**, BSA + β-merkaptto etanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1); **6. kuyucuk**, BSA + etanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (1).



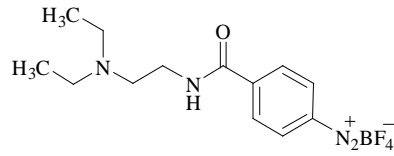
Fotoğraf 4.15. Bovine serum albumin (BSA)'nın, diazonyum tuzu (1) kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β-merkaptto etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (1); **3. kuyucuk**, BSA + β-merkaptto etanol + PhN₂⁺ (1); **4. kuyucuk**, BSA + etanol + PhN₂⁺ (1).

Antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid ilacından sentezlenen prokainamid tetrafloroborat tuzunun (2) bakır (I) klorür varlığında oluşan aril radikallerinin, protein ve DNA'da meydana getirdiği hasarı önlemeye karşı *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisi çalışıldı.



Fotoğraf 4.16. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (2) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (2); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **5. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g/mL}$); **6. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (50 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **7. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (100 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **8. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (250 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **9. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (500 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **10. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (750 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **11. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **12. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1500 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **13. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2000 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **14. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2500 $\mu\text{g/mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **15. kuyucuk**, DNA + metanol + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

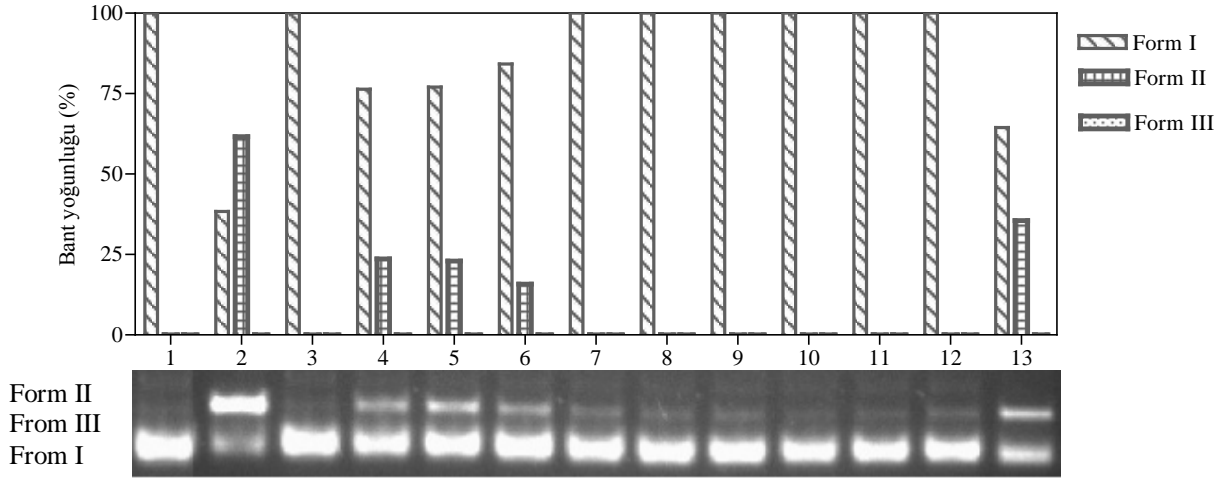


(2)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+CuCl	94,43	2,29	3,27
3	DNA+PhN ₂ ⁺	39,22		60,78
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺	25,97		74,03
5	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)	100		
6	DNA+ <i>M. longifolia</i> (50 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	44,87		55,13
7	DNA+ <i>M. longifolia</i> (100 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	15,17		84,83
8	DNA+ <i>M. longifolia</i> (250 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺			100
9	DNA+ <i>M. longifolia</i> (500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺			100
10	DNA+ <i>M. longifolia</i> (750 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺			100
11	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺			100
12	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	61,70		38,30
13	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	35,64		64,36
14	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	23,01		76,99
15	DNA+Metanol+CuCl+PhN ₂ ⁺	24,78		75,22

Tablo 4.10. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



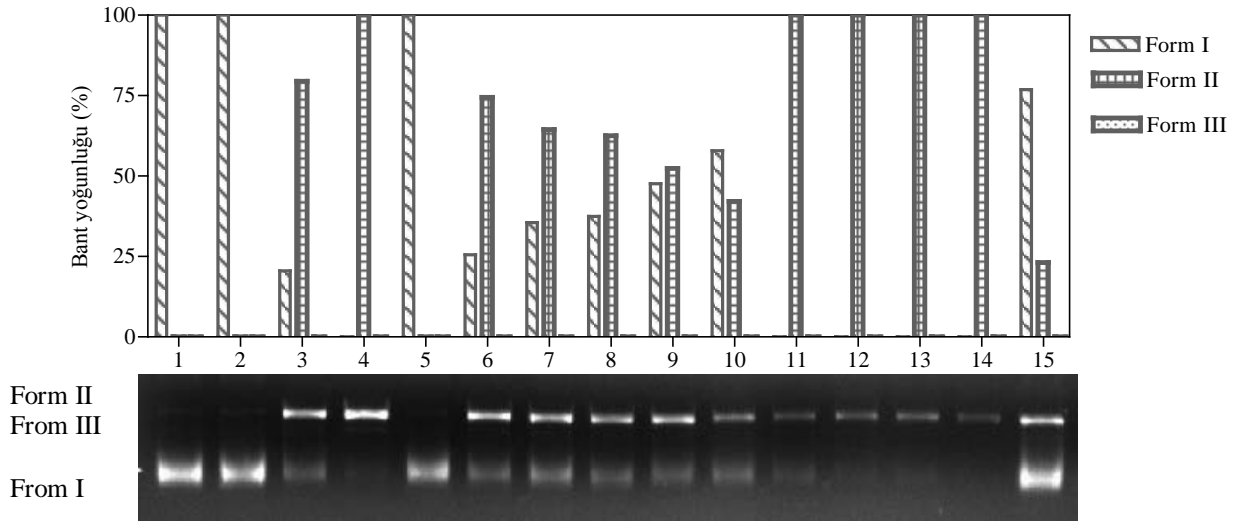
Fotoğraf 4.17. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, diazonyum tuzu (2) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (2); **3. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **4. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **5. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **6. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **7. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **8. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **9. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **10. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **11. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **12. kuyucuk**, DNA + *M. longifolia* (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PhN_2^+ (2); **13. kuyucuk**, DNA + metanol + PhN_2^+ (2).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+ PhN ₂ ⁺	38,40	61,60	
3	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)	100		
4	DNA+ <i>M. longifolia</i> (50 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	76,40	23,60	
5	DNA+ <i>M. longifolia</i> (100 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	77,07	22,93	
6	DNA+ <i>M. longifolia</i> (250 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	84,24	15,76	
7	DNA+ <i>M. longifolia</i> (500 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
8	DNA+ <i>M. longifolia</i> (750 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
9	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1000 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
10	DNA+ <i>M. longifolia</i> (1500 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
11	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2000 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
12	DNA+ <i>M. longifolia</i> (2500 µg/mL)+ PhN ₂ ⁺	100		
13	DNA+Metanol+ PhN ₂ ⁺	64,49	35,51	

Tablo 4.11. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, diazonyum tuzu (2) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



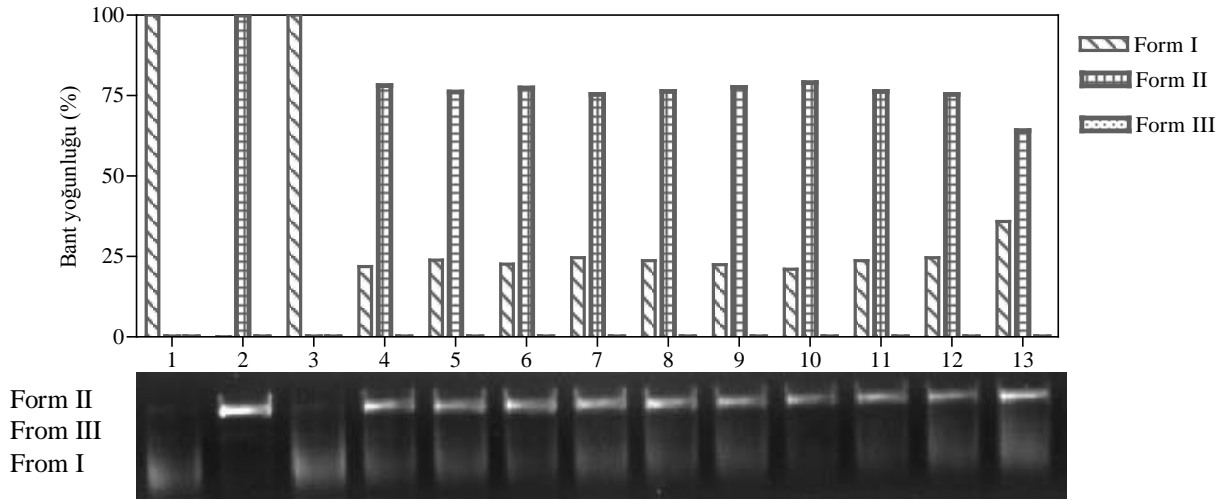
Fotoğraf 4.18. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (2) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (2); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **5. kuyucuk**, DNA + UY (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **6. kuyucuk**, DNA + UY (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **7. kuyucuk**, DNA + UY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **8. kuyucuk**, DNA + UY (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **9. kuyucuk**, DNA + UY (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **10. kuyucuk**, DNA + UY (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **11. kuyucuk**, DNA + UY (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **12. kuyucuk**, DNA + UY (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **13. kuyucuk**, DNA + UY (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **14. kuyucuk**, DNA + UY (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **15. kuyucuk**, DNA + petrol eteri + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+CuCl	100		
3	DNA+PhN ₂ ⁺	20,57	79,43	
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	
5	DNA+UY (1000 µg/mL)	100		
6	DNA+UY (50 µg/mL)+CuCl	25,54	74,46	
7	DNA+UY (100 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	35,54	64,46	
8	DNA+UY (250 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	37,42	62,58	
9	DNA+UY (500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	47,61	52,39	
10	DNA+UY (750 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺	57,91	42,09	
11	DNA+UY (1000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	
12	DNA+UY (1500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	
13	DNA+UY (2000 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	
14	DNA+UY (2500 µg/mL)+CuCl+PhN ₂ ⁺		100	
15	DNA+Petrol eteri+CuCl+PhN ₂ ⁺	76,90	23,10	

Tablo 4.12. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin pBluescript M13+ plazmid DNA kesimine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



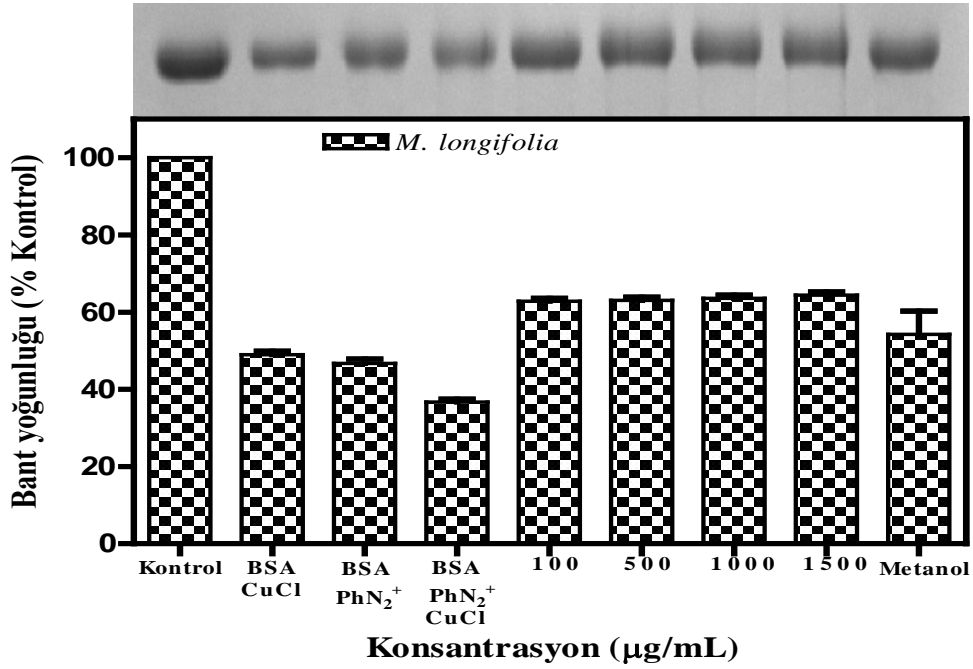
Fotoğraf 4.19. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (2) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + PhN₂⁺ (2); **3. kuyucuk**, DNA + UY (1000 µg/mL); **4. kuyucuk**, DNA + UY (50 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, DNA + UY (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, DNA + UY (250 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **7. kuyucuk**, DNA + UY (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **8. kuyucuk**, DNA + UY (750 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **9. kuyucuk**, DNA + UY (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **10. kuyucuk**, DNA + UY (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **11. kuyucuk**, DNA + UY (2000 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **12. kuyucuk**, DNA + UY (2500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **13. kuyucuk**, DNA + petrol eteri + PhN₂⁺ (2).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

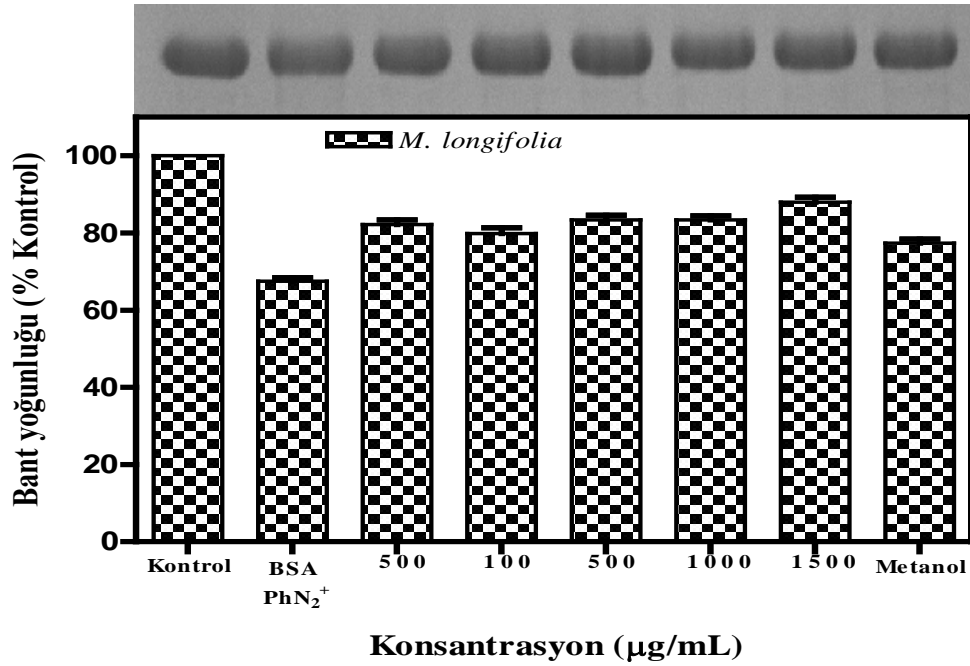
Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100		
2	DNA+PhN ₂ ⁺		100	
3	DNA+UY (1000 µg/mL)	100		
4	DNA+UY (50 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	21,88	78,12	
5	DNA+UY (100 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	23,90	76,10	
6	DNA+UY (250 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	22,66	77,34	
7	DNA+UY (500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	24,63	75,37	
8	DNA+UY (750 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	23,74	76,26	
9	DNA+UY (1000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	22,43	77,57	
10	DNA+UY (1500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	21	79	
11	DNA+UY (2000 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	23,68	76,32	
12	DNA+UY (2500 µg/mL)+PhN ₂ ⁺	24,59	75,41	
13	DNA+Petrol eteri+ PhN ₂ ⁺	34,86	64,14	

Tablo 4.13. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (2) varlığında pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine olan etkisinin incelenmesi.

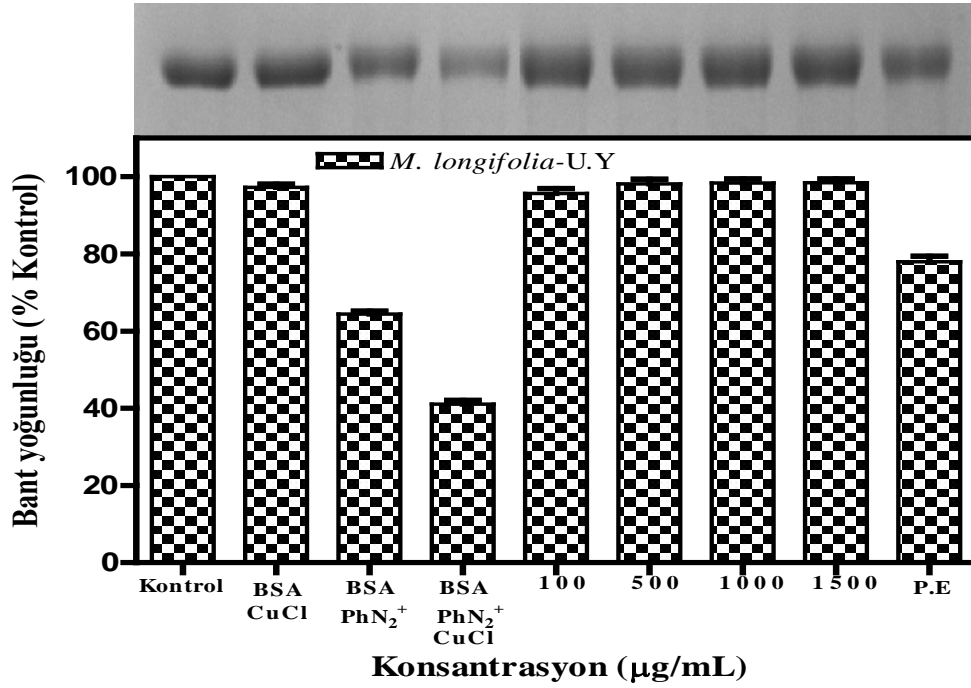
*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



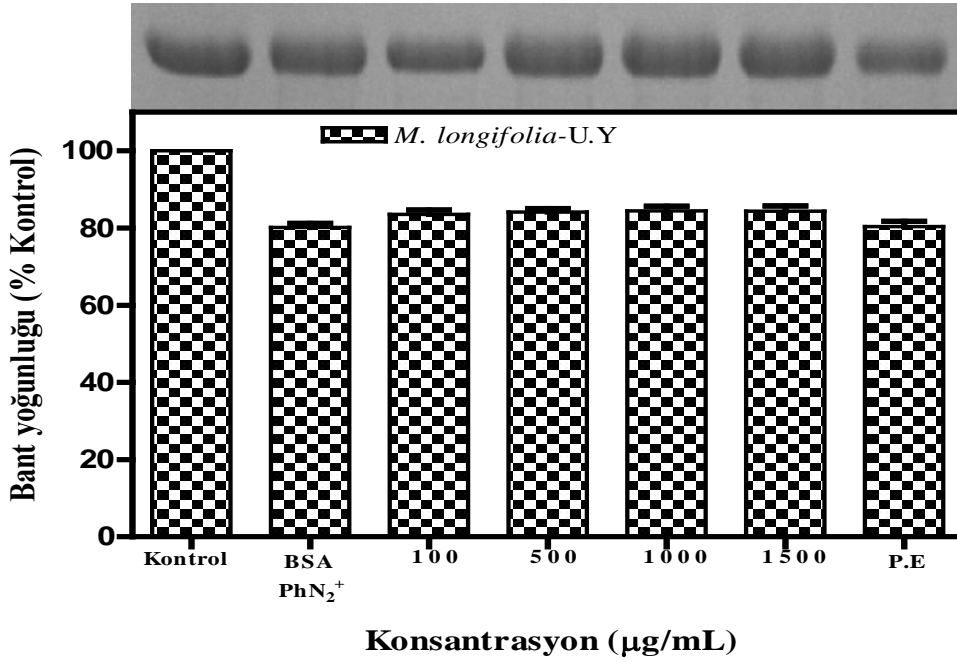
Fotoğraf 4.20. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif BSA hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (2) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **7. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **8. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **9. kuyucuk**, BSA + metanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2).



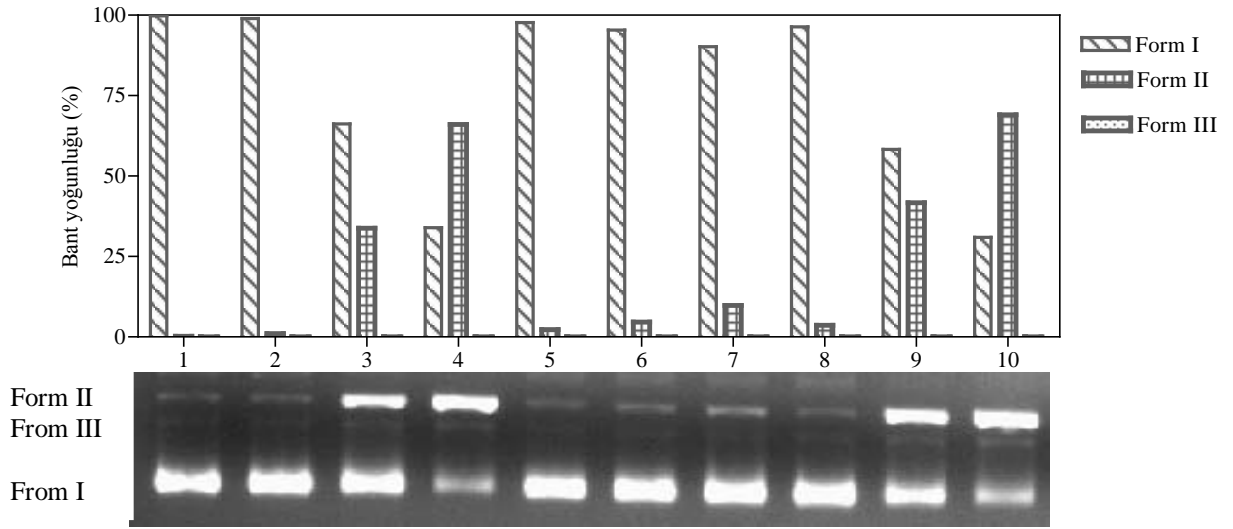
Fotoğraf 4.21. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, diazonyum tuzu (2) varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **3. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL); **4. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **7. kuyucuk**, BSA + *M. longifolia* (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **8. kuyucuk**, BSA + metanol + PhN₂⁺ (2).



Fotoğraf 4.22. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu BSA oksidatif hasarına karşı koruyucu etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar bakır (I) klorür ile diazonyum tuzu (2) varlığında karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, BSA + UY (100 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **7. kuyucuk**, BSA + UY (1000 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **8. kuyucuk**, BSA + UY (1500 µg/mL) + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **9. kuyucuk**, BSA + petrol eteri + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2).



Fotoğraf 4.23. *M. longifolia* bitkisinin Uçucu Yağının (UY), diazonyum tuzu (2) varlığında BSA üzerine olan etkisinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **3. kuyucuk**, BSA + UY (100 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **4. kuyucuk**, BSA + UY (500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, BSA + UY (1000 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, BSA + UY (1500 µg/mL) + PhN₂⁺ (2); **7. kuyucuk**, BSA + petrol eteri + PhN₂⁺ (2).



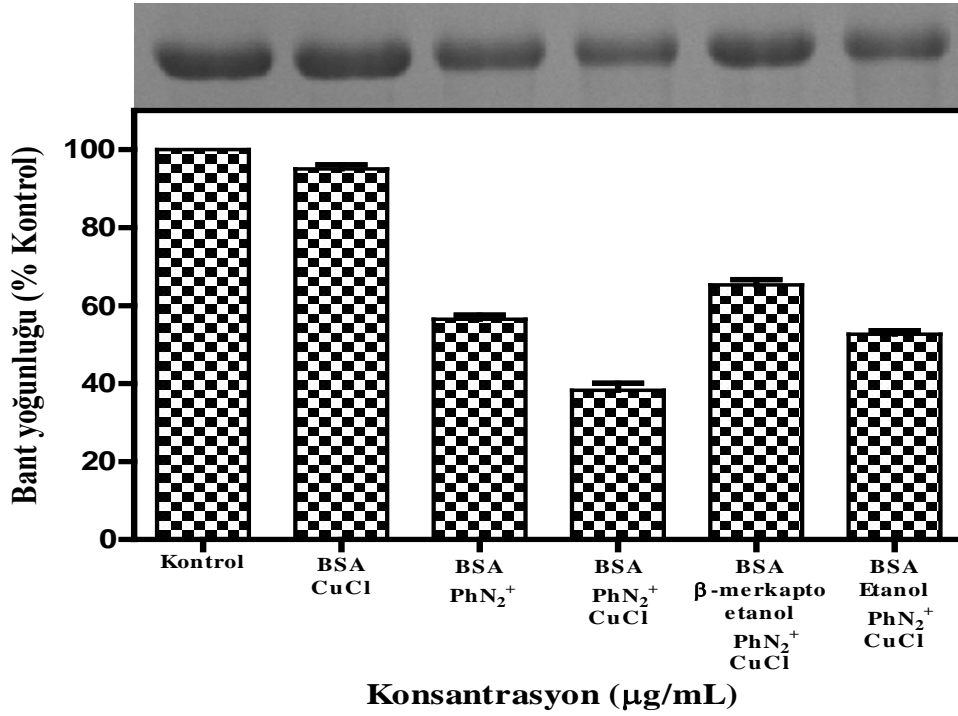
Fotoğraf 4.24. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (2) ile kesim reaksiyonunun etanol ve β -merkapt etanol varlığında Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, DNA; **2. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, DNA + PhN_2^+ (2); **4. kuyucuk**, DNA + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **5. kuyucuk**, DNA + β -merkapt etanol; **6. kuyucuk**, DNA + β -merkapt etanol + PhN_2^+ (2); **7. kuyucuk**, DNA + β -merkapt etanol + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2); **8. kuyucuk**, DNA + etanol; **9. kuyucuk**, DNA + etanol + PhN_2^+ (2); **10. kuyucuk**, DNA+ etanol + bakır (I) klorür + PhN_2^+ (2).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

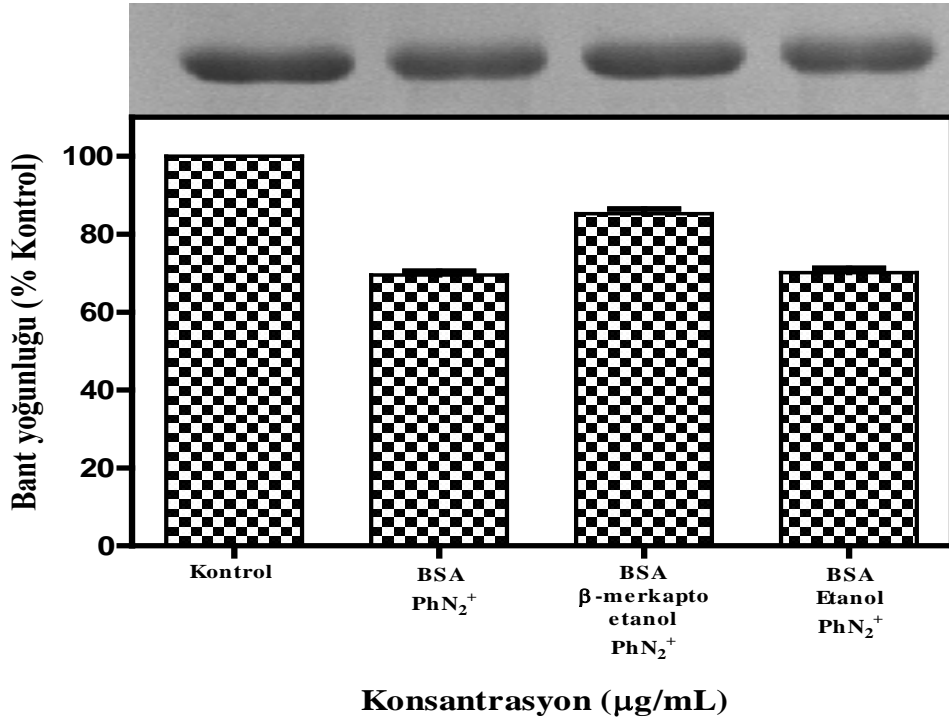
Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	99,78	0,22	
2	DNA+CuCl	98,92	1,08	
3	DNA+PhN ₂ ⁺	66,18	33,82	
4	DNA+CuCl+PhN ₂ ⁺	33,93	66,07	
5	DNA+β-merkapt etanol	97,72	2,28	
6	DNA+β-merkapt etanol+PhN ₂ ⁺	95,34	4,66	
7	DNA+β-merkapt etanol+PhN ₂ ⁺ +CuCl	90,17	9,83	
8	DNA+Etanol	96,37	3,63	
9	DNA+Etanol+PhN ₂ ⁺	58,31	41,69	
10	DNA+Etanol+PhN ₂ ⁺ +CuCl	30,93	69,07	

Tablo 4.14. pBluescript M13+ plazmid DNA'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (2) ile etanol ve β-merkapt etanolün etkisinin incelenmesi.

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



Fotoğraf 4.25. Bovine serum albumin (BSA)'nın, bakır (I) klorür ve diazonyum tuzu (2) kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β-merkapto etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür; **3. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **4. kuyucuk**, BSA + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **5. kuyucuk**, BSA + β-merkapto etanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2); **6. kuyucuk**, BSA + etanol + bakır (I) klorür + PhN₂⁺ (2).



Fotoğraf 4.26. Bovine serum albumin (BSA)'nın, diazonyum tuzu (2) kaynaklı BSA oksidasyonunun, etanol ve β-merkapt etanol varlığında SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Reaksiyonlar karanlıkta, oda sıcaklığında iki saatte gerçekleştirildi. **1. kuyucuk**, BSA; **2. kuyucuk**, BSA + PhN₂⁺ (2); **3. kuyucuk**, BSA + β-merkapt etanol + PhN₂⁺ (2); **4. kuyucuk**, BSA + etanol + PhN₂⁺ (2).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İdiyosinkratik ilaç reaksiyonları (İİR), ilacın bilinen farmakolojik toksik profili ile açıklanamayan ve karakteristik özellikleri taşımayan reaksiyonlardır. İİR'nin en önemlilerinden biri agranülositozdur. Nötrofillerin yapısında bulunan granüller tükendiği zaman bu durum ortaya çıkar. Nötrofillerin normal sayısı 5000-10,000 hücre/ μ L'dir. Oysaki, agranülositoz olduğu durumda, bu sayı 500 hücre/ μ L'den daha az olur. İlaç kaynaklı agranülositoz genellikle geri dönüşümlüdür ve ilaç kullanmayı bıraktıktan yaklaşık 1 hafta sonra nötrofil sayısı normale döner veya normalin üzerine çıkar. Bu zaman aralığında agranülositoz ciddi bir enfeksiyon kasılmasına neden olur ve bazı durumlarda enfeksiyon riskinin artması, nötrofillerin geri kazanılmasını geciktirir. İlaç kaynaklı agranülositozun neden olduğu ölüm oranı yaklaşık %10'dur.

Her ilacın bir konsantrasyon aralığı vardır. Bu aralık en düşük ve en yüksek dozda vücuda zarar vermeden olası minimum yan etkilerle seyreden bir tedaviyi ifade eder. Oysa bu konsantrasyon aralığının altında veya üstünde ilaçlar kullanılırsa, bu ilaçların yan etkileri ortaya çıkar. Bazı antitiroid, antibiyotik, antidepresan, antikanser ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan, aromatik amin içeren ilaçların insanlarda aril radikallerine dönüştüğü, daha sonra bu radikallerin myeloperoksidaz (MPO)/H₂O₂ metabolizması aracılığıyla bir protein radikali oluşturduğunu ve bu durumda yan etki olarak agranülositosis (nötrofil azalması) hastalığına neden olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Meydana gelen bu hastalık sonucunda vücudun bağışıklık sistemi zayıflamakta ve en küçük bir hastalık etmeninde bile canlı enfeksiyon kapabilmektedir, bu durum çoğu hasta için hayati önem taşımaktadır. Serbest radikaller tarafından meydana gelen protein oksidasyonu, hücre içerisindeki oksidatif süreçlerde önemli rol oynar. Bu durumunda, insanlarda bir çok hastalık ve yaşlanmada rol aldığı bilinmektedir (Clare ve ark. 2001). Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır, ancak proteinin aminoasit içeriğine göre radikalik hasardan etkilenme derecesi değişir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Radikaller ve oksidantlar, amino asitler, peptitler ve proteinler ile çeşitli reaksiyonlar verebilir. Bunların arasında hidrojen

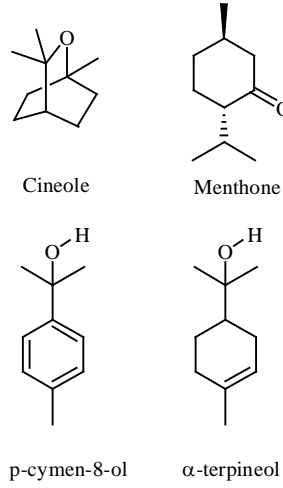
koparma (radikal tarafından hidrojen koparma), elektron transferi (substratın indirgenme veya yükseltgenmesi), parçalanma ve yeniden düzenlenme bulunur (Michael 2006). Bu reaksiyonlar sonucunda protein hidrolizlenir.

Bu çalışmada, antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid ilacının diazonyum tuzunun meydana getirdiği aril radikallerinin, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağı ile söndürme etkisi araştırıldı. Bu amaçla karbon merkezli aril radikali oluşturup, DNA kesimine neden olduğu bilinen 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat model olarak seçildi. 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ve prokainamid tetrafloroborat tuzlarından oluşan aril radikallerinin, protein ve DNA'da meydana getirdiği hasarı önlemeye karşı *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisi çalışıldı.

Son zamanlarda bitkilerde bulunan polifenoller/flavonoidler doğal antioksidant olarak araştırmacılar arasında çok ilgi görmüştür. Serbest-radikal söndürücüler veya temel antioksidantlar olarak davranan bileşiklerin başlıca gruplarından biri olarak bitki fenolikleri oldukça önemli yer tutmaktadır. Aynı genel yapıyı paylaşan fenolikler aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarından oluşurlar ve içerdikleri bu hidroksil gruplarından dolayı radikal söndürücü özelliği olan çok önemli bitki bileşenleridir (Karaman ve ark. 2009, Öztürk ve ark. 2011). Folin-Ciocalteu indirgeme kapasite analizi (FCR) bitkilerdeki toplam fenolik bileşikleri belirlemek için sıklıkla kullanılır (Gülçin ve ark. 2003a, Oktay ve ark. 2003). Gıdalardaki toplam fenolik bileşenler alkalik ortamındaki fenolik bileşenlerden elektronların transferiyle Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesine göre değerlendirilir ve metot kolaylıkla ve yaygın bir şekilde kullanılır (Singleton ve Rossi 1965, Cai ve ark. 2004; Song ve ark. 2010).

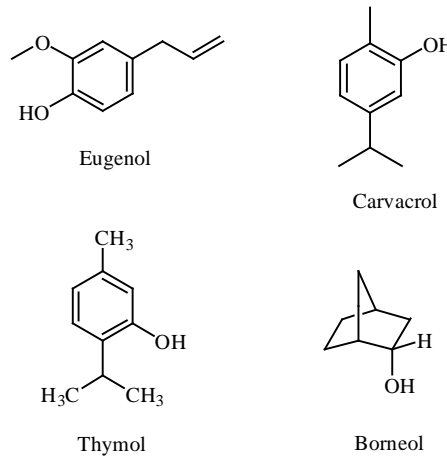
M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının 1 mg/mL'lik çözeltisinin içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre ekstrakt $147,59 \pm 1,15 \mu\text{g}$, uçucu yağ ise $4,98 \pm 0,52 \mu\text{g}$ gallik aside eşdeğer olarak bulundu (Tablo 4.1). Miliauskas ve ark. (2004), *Salvia sclarea* bitkisi ile yaptıkları antioksidant aktivite çalışmasında bu bitkinin (1 mg/mL) metanol ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarının $24.0 \pm 1.1 \mu\text{g}$ gallik aside eşdeğer olduğunu tespit etmişlerdir. Konsantrasyon ve elde edilen değer dikkate alındığında *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının fenolik bileşen miktarının *S. sclarea* bitkisinin metanol ekstraktından daha

yüksek olduğu ve antioksidant aktiviteye sahip olduğunu gösterir. *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının şekil 5.1'deki bileşenleri dikkate alındığında içerdiği cineole, menthone, p-cymen-8-ol, α -terpineol gibi bileşenlerin yapısındaki küçük alkolik fonksiyonel gruplarından dolayı radikal söndürücü özelliğe sahiptir.



Şekil 5.1. *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri

Horvathova ve ark. 2014, yapmış oldukları bir çalışmada *Rosmarinus* bitkisinin uçucu yağ bileşenlerinin (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) antioksidatif, şelatlama ve DNA koruyucu etkilerini çalışmışlar (Şekil 5.2). Yapılan çalışmalar sonucunda, eugenol, carvacrol ve thymol bileşenlerinin güçlü antioksidant etki gösterirken, borneol ve eucalyptol ise DNA koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Borneol küçük alkolik fonksiyonel gruplar ve aromatik halkaya sahip hidroksil grupları bulundurduğundan dolayı Fe^{2+} iyonlarıyla şelatlama etkisi yaparak DNA hasarına karşı güçlü bir koruyucu etki ortaya koyduğunu rapor edilmiştir.



Şekil 5.2. *Rosmarinus* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının 1 mg/mL'lik çözeltisinin içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı metanol ekstraktı için $16,12 \pm 0,38$ µg, uçucu yağ için ise $1,84 \pm 0,032$ µg quercetine eşdeğer olarak bulundu (Tablo 4.2). Miliuskas ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, *Matricaria recutita* bitkisi ile yaptıkları antioksidant aktivite çalışmasında bu bitkinin (1 mg/mL) metanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktarının 7.1 ± 0.4 µg quercetine eşdeğer olduğunu tespit etmişlerdir. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının flavonoid bileşen miktarının *M. recutita* bitkisinin metanol ekstraktından daha yüksek olduğu ve antioksidant aktiviteye sahip olduğunu gösterir.

4-kloro-2-nitro tetrafloroborat tuzundan oluşan aril radikallerinin, protein ve DNA'da meydana getirdiği hasarı önlemeye karşı *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisi incelendi.

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu DNA kesimine karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, konsantrasyona bağlı olmadan koruma etkisi gözlemlendi (Fotoğraf 4.1., kuyucuk 5-15).

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının bakır (I) klorür varlığında DNA üzerine olan etkisini incelemek için kontrol deneyi yapıldı. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının tek başına DNA'nın yapısında herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü. Bakır (I) klorüründe tek başına DNA'nın yapısında herhangi bir etkisinin olmadığı fakat düşük konsantrasyonlarda *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının varlığında, konsantrasyon arttıkça supercoiled formun azaldığı (Fotoğraf 4.2., kuyucuk 4-10), son iki konsantrasyonda ise (2000, 2500 µg/mL) konsantrasyona bağlı olarak supercoiled formun korunduğu gözlemlendi. Hadi ve arkadaşları, Cu^{2+} iyonları varlığında bitki ekstraktları tarafından DNA kesim mekanizmasında aromatik çekirdeklerin oksijenlenmesinin rol aldığını rapor etmişler. Bunun sonucunda katekol oluştuğunu ve bu oluşan katekol Cu^{2+} ile koordinasyon yaptığını yaptıkları çalışmalarda gözlemlemişler. Oluşan bu koordinasyon bileşiği dioksijeni daha reaktif türlere indirgedikten sonra katekolün Cu^{2+} iyonu ile koordinasyonu sonucu oksidasyona uğradığını tespit etmişlerdir. Önceki çalışmalarda antioksidant ve antimikrobiyal

aktiviteleri olduğu belirlenen bazı bitki ekstraktların içerisinde bulunan flavonoidlerin Cu^{2+} ile kompleks oluşturarak DNA'yı kestiğini belirtmişler (Shoa ve ark. 2010).

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında DNA üzerine olan etkisi incelendiğinde, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ile DNA tek başına ~%56 supercoiled formdan open circular forma dönüşümün olduğu ve ortama *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı eklendiği zaman, diazonyum tuzundan kaynaklı DNA kesimini tamamen önlediği gözlemlendi (Fotoğraf 4.3., tablo 4.5).

M. longifolia bitkisinin uçucu yağının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu DNA kesimine karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, DNA 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ile tek başına ~%73 supercoiled formdan open circular forma dönüşümü gözlemlendi. *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının kesimi önlediği fakat supercoiled formunun tamamının open circular ve lineer forma dönüşümünü önleyemediği tespit edildi (Fotoğraf 4.4., tablo 4.6). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, bakır (I) klorür varlığında DNA üzerine olan etkisi incelendiğinde, herhangi bir etkinin olmadığı görüldü (Fotoğraf 4.5). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında DNA üzerine olan etkisi incelendiğinde, artan konsantrasyonuna bağlı olarak DNA kesim etkisinin azaldığı gözlemlendi (Fotoğraf 4.6).

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin (Fotoğraf 4.7., kuyucuk 4) neden olduğu oksidatif Bovine serum albumin (BSA) hasarına karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, artan konsantrasyona bağlı olarak %25-46 oksidasyonu inhibe ettiği gözlemlendi (Fotoğraf 4.7., kuyucuk 6-9).

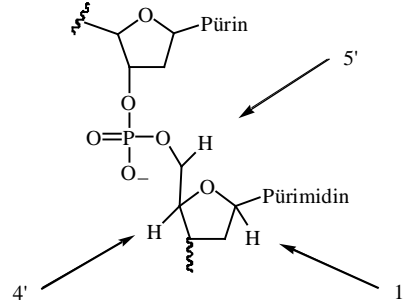
M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı tek başına %12,46 BSA oksidasyonuna neden olduğu (Fotoğraf 4.8., kuyucuk 3) ve *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının oksidasyon etkisinin artan konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görüldü (Fotoğraf 4.8., kuyucuk 4-7). *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın tek başına BSA oksidasyonuna neden

olduğu (Fotoğraf 4.9., kuyucuk 2), *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak oksidasyonun azaldığı gözlemlendi (Fotoğraf 4.9., kuyucuk 4-7).

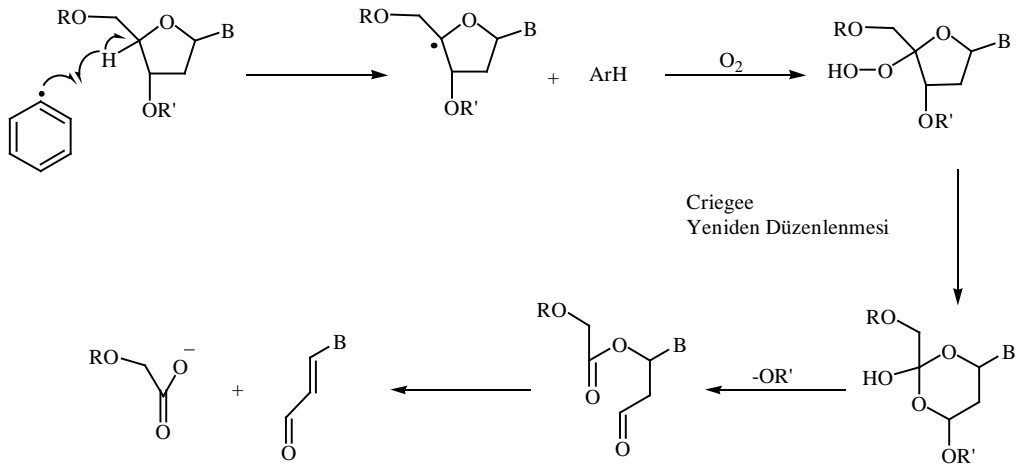
M. longifolia bitkisinin uçucu yağının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratin bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu oksidatif Bovine serum albumin (BSA) hasarına karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, bakır (I) klorürün tek başına BSA üzerine bir etkisi olmadığı (Fotoğraf 4.10., kuyucuk 2), 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat BSA'yı oksidatif hasara uğrattığı (Fotoğraf 4.10., kuyucuk 3) ve her ikisinin beraber olduğu kuyucukta ise BSA oksidatif hasarının arttığı tespit edildi (Fotoğraf 4.10., kuyucuk 4). Ortama farklı konsantrasyonlarda *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının eklenmesiyle, konsantrasyona bağlı olarak BSA'yı aril radikallerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı ~%61-95 koruyucu etki gösterdiği gözlemlendi (Fotoğraf 4.10., kuyucuk 6-9).

M. longifolia bitkisinin uçucu yağının, bakır (I) klorür varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının bakır (I) klorür varlığında BSA'yı oksidatif hasara uğrattığı ve oksidatif hasarın konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Düşük konsantrasyonlarda (100, 500 µg/mL) oksidatif hasar daha fazla iken, yüksek konsantrasyonlarda (1000, 1500 µg/mL) oksidatif hasarın azaldığı görüldü (Fotoğraf 4.11., kuyucuk 4-7). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, artan konsantrasyonlarına bağlı olarak oksidatif hasarın azaldığı gözlemlendi (Fotoğraf 4.12., kuyucuk 4-7).

Literatürde diazonyum tuzlarının bir elektron verici varlığında DNA'yı kestiğini belirten bir çok çalışma vardır (Barış 2004, Kızıl 2003). Diazonyum tuzlarının DNA'yı kesim mekanizması, deoksiriboz şekerden hidrojen atomu koparılmasıyla gerçekleşir (Şekil 5.4.). Aril radikalleri için DNA deoksiriboz şekerinin 5', 4' ve 1' Hidrojen atomunu (Şekil 5.3.) koparmak diğer hidrojen atomlarına oranla daha kolaydır (Behr 1989).



Şekil 5.3. Deoksiriboz şekerinden 1', 4' ve 5' hidrojen atomları



Şekil 5.4. 4' Hidrojen atomu koparılması

Diazonyum tuzlarının aril radikali oluşturarak DNA'yı kestiği bilinmektedir (Şekil 5.4.). Karbon merkezli aril radikallerin DNA kesiminde etkili olup olmadığını anlamak için, önceki çalışmalarda karbon merkezli radikalleri söndürme etkisi olduğu bilinen etanol ve β -merkapt etanol denendi (Hiramoto 1995). DNA kesimi incelenen 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat tuzunun bakır (I) klorür varlığında karbon merkezli radikalleri oluşturarak DNA kesimine sebep oluyorsa etanol ve β -merkapt etanol gibi karbon merkezli radikalleri söndürdüğü bilinen maddelerle beraber kullanıldığı zaman DNA kesiminin önlenmesi gerekmektedir.

Bu amaçla DNA kesiminin, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşan karbon merkezli radikalleri tarafından gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için etanol ve β -merkapt etanol ile kontrol deneyi yapıldı. İlk olarak 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın DNA kesim etkisi β -merkapt etanol varlığında ~%48 inhibe edilirken, 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşan karbon merkezli radikallerinin DNA kesimi β -merkapt etanol varlığında ~%73 oranında inhibe edildiği gözlemlendi. Etanol'de ise herhangi bir inhibisyonun olmadığı görüldü. Elde edilen bu sonucun, DNA'da meydana gelen kesimin karbon merkezli radikaller tarafından gerçekleştiğini desteklemektedir (Fotoğraf 4.13., Tablo 4.9).

BSA'nın, bakır (I) klorür varlığında ve yokluğunda 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat ile aril radikal kaynaklı olduğu düşünülen BSA oksidatif hasarının, karbon merkezli radikalleri söndürme kapasitesi olduğu bilinen etanol ve β -merkapt etanol ile test edildiğinde (Hiramoto 1995), 4-kloro-2-nitro tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşan karbon merkezli radikallerin BSA'da oksidatif hasara neden olduğu (Fotoğraf 4.14., kuyucuk 3), β -merkapt etanol ilave edildiğinde BSA oksidasyonunun ~%60 inhibe edildiği (Fotoğraf 4.14., kuyucuk 5), etanol varlığında ise ~%46 inhibe edildiği gözlemlendi (Fotoğraf 4.14., kuyucuk 6). Bakır (I) klorür yokluğunda yapılan deneyde, β -merkapt etanol'un, 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat tuzundan kaynaklı BSA oksidatif hasarının ~%14 (Fotoğraf 4.15., kuyucuk 3), etanolün ise ~%22 inhibe edildiği tespit edildi (Fotoğraf 4.15., kuyucuk 4).

Yapılan model çalışmadan sonra, antiaritmik hastalıkların tedavisinde kullanılan prokainamid ilacından sentezlenen prokainamid tetrafloroborat tuzunun bakır (I) klorür varlığında oluşan aril radikallerinin, protein ve DNA'da meydana getirdiği hasarı

önlemeye karşı *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının koruyucu etkisi incelendi.

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu DNA kesimine karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, kontrol olarak kullanılan bakır (I) klorürün DNA kesimi üzerine çok fazla bir etkisinin olmadığı (Fotoğraf 4.16., kuyucuk 2), prokainamid tetrafloroboratın DNA kesimini artırdığı (Fotoğraf 4.16., kuyucuk 3), bakır (I) klorür ve prokainamid tetrafloroborat birlikte kullanıldığı zaman supercoiled formun ~%74'nün lineer forma dönüştüğü tespit edildi (Fotoğraf 4.16., kuyucuk 4). 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda supercoiled formun tamamının lineer forma dönüştüğü (Fotoğraf 4.16., kuyucuk 8-11), 2000, 2500 µg/mL'da ise DNA kesimi üzerine bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Fotoğraf 4.16., kuyucuk 13-14). Prokainamid tetrafloroborat tek başına iken meydana getirdiği kesimi *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı tarafından koruma etkisi yüksek iken, prokainamid tetrafloroborat ve bakır (I) klorür varlığında meydana gelen kesimin çok fazla önlenmediği tespit edildi. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının prokainamid tetrafloroborat varlığında meydana gelen DNA kesim etkisi incelendiğinde ise, düşük konsantrasyonlarda konsantrasyona bağlı olarak DNA kesiminin azaldığı supercoiled formun geri kazanıldığı (Fotoğraf 4.17., kuyucuk 4-6), konsantrasyon arttıkça supercoiled formun tamamen korunduğu gözlemlendi (Fotoğraf 4.17., kuyucuk 7-12).

M. longifolia bitkisinin uçucu yağının, prokainamid tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu DNA kesimine karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, konsantrasyona bağlı olarak, prokainamid tetrafloroborat ve bakır (I) klorürün neden olduğu DNA kesiminin azaldığı ve supercoiled formun korunduğu tespit edildi (Fotoğraf 4.18., kuyucuk 6-10). Yüksek konsantrasyonların DNA kesimi üzerine etkisinin olmadığı görüldü (Fotoğraf 4.18., kuyucuk 11-14). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, prokainamid tetrafloroborat varlığında DNA üzerine olan etkisi incelendiğinde ise konsantrasyona bağlı olmadan DNA kesimini kısmen önlediği görüldü (Fotoğraf 4.19).

Proteinler, hücre ve dokunun önemli elemanlarıdır. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerine karşı savunmasızdırlar. Bu tür radikaller protein oksidasyonuna

neden olur. Prokainamid tetrafloroborat veya 4-kloro-2-nitro tetrafloroborat, bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikalleri, fosfat tamponu içerisindeki BSA proteini ile inkübe edildiğinde, BSA'da oksidatif hasar meydana getirir. *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının aril radikalleri sonucu oluşan BSA oksidatif hasarının önleyici etkisi çalışıldı.

M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu Bovine serum albumin (BSA) oksidatif hasarına karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, kontrol olarak kullanılan bakır (I) klorür (Fotoğraf 4. 20., kuyucuk 2) ve prokainamid tetrafloroborat (Fotoğraf 4.20., kuyucuk 3) her ikisinde ayrı ayrı BSA oksidatif hasarına neden olduğu, ikisinin birlikte kullanıldığında ise BSA oksidatif hasarının arttığı gözlemlendi (Fotoğraf 4.20., kuyucuk 4). *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının artan konsantrasyonuna bağlı olarak (100, 500, 1000, 1500µg/mL) BSA oksidatif hasarını ~%24-26 önlediği tespit edildi (Fotoğraf 4.20., kuyucuk 6-9). *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının, prokainamid tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktının artan konsantrasyonlarda BSA oksidatif hasarı ~%12-49 önlediği görüldü (Fotoğraf 4.21., kuyucuk 4-7). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, prokainamid tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin neden olduğu BSA oksidatif hasarına karşı koruyucu etkisi incelendiğinde, oluşan BSA oksidatif hasarı, *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının artan konsantrasyonuna bağlı olarak ~%84-97 önlediği gözlemlendi (Fotoğraf 4.22., kuyucuk 6-9). *M. longifolia* bitkisinin uçucu yağının, prokainamid tetrafloroborat varlığında BSA üzerine olan etkisi incelendiğinde, artan konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağlı olarak BSA oksidatif hasarının önlediği görüldü (Fotoğraf 4.23., kuyucuk 4-7).

Prokainamid tetrafloroboratın, karbon merkezli radikalleri söndürme etkisi olduğu bilinen etanol ve β-merkapt etanol ile bakır (I) klorür varlığında ve yokluğunda DNA kesimi incelendi. Etanol ve β-merkapt etanol varlığında prokainamid tetrafloroboratın DNA kesim etkisinin, bakır (I) klorür olmadan β-merkapt etanol varlığında ~%86 iken bakır (I) klorürün varlığında da DNA kesiminin ~%86 oranında inhibe edildiği görüldü. Etanol'de ise yine bir önlemenin olmadığı gözlemlendi. Elde

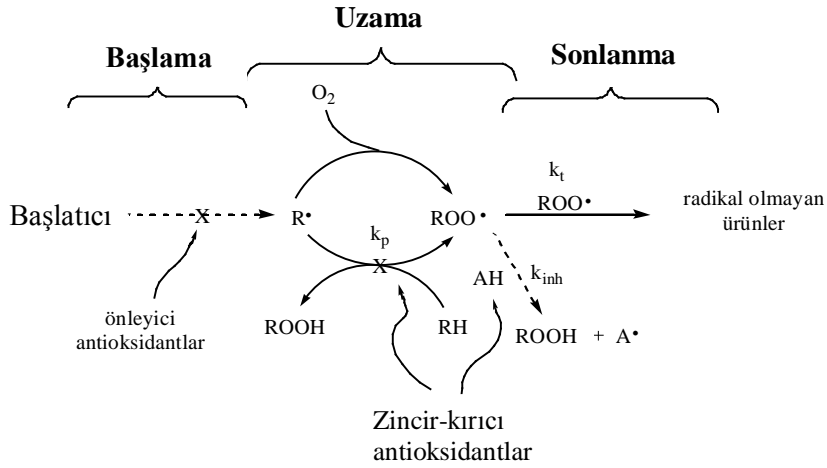
edilen bu sonucun, DNA’da meydana gelen kesimin karbon merkezli radikal üzerinden gerçekleştiğini destekler niteliktedir (Fotoğraf 4.24., Tablo 4.14).

Prokainamid tetrafloroboratın bakır (I) klorür varlığında oluşturduğu karbon merkezli aril radikallerinin BSA’da oksidatif hasar meydana getirdiği düşünülmektedir. Karbon merkezli radikalleri söndürme kapasitesi olduğu bilinen etanol ve β -merkapt etanol ile test edildiğinde, prokainamid tetrafloroborat, bakır (I) klorür ve BSA’nın bulunduğu kuyucukta oksidatif hasarın olduğu (Fotoğraf 4.25., kuyucuk 4), bunlara ek olarak β -merkapt etanol ilave edildiğinde BSA oksidatif hasarın ~%46 inhibe edildiği (Fotoğraf 4.25., kuyucuk 5), etanol eklendiğinde ise ~%25 inhibe edildiği gözlemlendi (Fotoğraf 4.25., kuyucuk 6). Bakır (I) klorür yokluğunda yapılan deneyde, β -merkapt etanol’un, prokainamid tetrafloroborat tuzundan kaynaklı BSA oksidatif hasarın ~%55 (Fotoğraf 4.26., kuyucuk 3), etanolün ise ~%3 inhibe ettiği tespit edildi (Fotoğraf 4.26., kuyucuk 4).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antioksidantlar, radikallerle reaksiyona girebilen veya radikallerin neden olduğu oksidatif stresin etkisini azaltan moleküller olarak tanımlanırlar. Doğal ürünlerin veya izole edilen fotokimyasalların antioksidant aktivite deneyleri için kimyasal birkaç test geliştirilmiştir (DPPH, ABTS ve FRAB gibi).

Antioksidantlar oksitleme kapasitesini yavaşlatabilen veya geciktiren bileşiklere sahiptir. Biyolojik sistemde ve besin biliminde, korunması gereken materyaller çok yaygın olarak hayvan ve bitki dokularında bulunan lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve küçük miktarlardaki diğer organik bileşiklerdir. Onların oksidasyonu, peroksi radikalleri aracılığıyla bir radikal zincir reaksiyonuyla oluşur. Bu süreç şemadaki gibidir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. Hidrokarbon otooksidasyonunun ve antioksidant korumanın mekanizması

Bu süreç bazı radikal türleriyle başlar ve substratın (lipid, protein gibi) herhangi bir bölgesinden rastgele hidrojen atomu kopararak bir alkil/aryl radikali oluştururlar ve oksijenle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek peroksi radikali oluştururlar. Klasik olarak peroksi radikali diğer makro-moleküllere veya diğer radikallere saldırarak hidroperoksit oluştururlar. Bu basamağa sonlanma evresi denir. Başlama ve sonlanma arasında birden çok basamak meydana gelir ve zincir uzama evresi olarak adlandırılır. Bu radikal zincir reaksiyonuna zarar veren bileşiklere doğrudan antioksidantlar denir ve radikallere müdahale mekanizması bakımından ikiye ayrılırlar.

(a) **Önleyici antioksidant** başlama sürecine müdahale eder, yani, radikal başlama sürecini geciktirir. Bunlara örnek olarak katalaz enzimi, metal şelatörler gibi maddeler verilebilir.

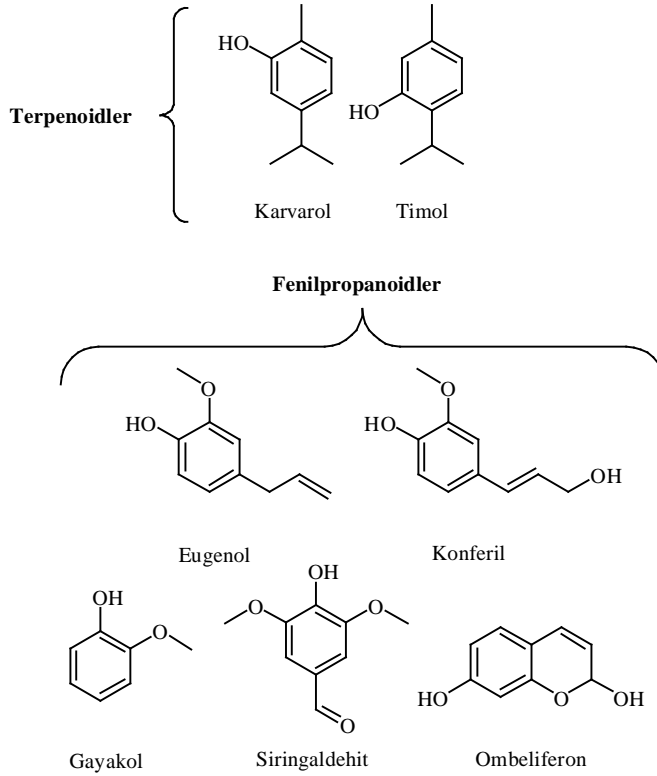
(b) **Zincir kırıcı antioksidantlar** ise zincir uzama reaksiyonu ile yarışarak otooksidasyonu yavaşlatır veya bloke eder, yani peroksi radikali ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek zincir uzama reaksiyonunu engeller. Önleyici antioksidantlar etkisiz olduğu durumlarda zincir kırıcı antioksidantlar harekete geçerek aktivite gösterirler. Onların etkinlikleri peroksi radikalının reaksiyon kinetiği ile bağlantılıdır ve zincir uzama reaksiyonun hızıyla kıyaslanır.

(i) radikal türleri oksidatif zincir taşıyıcı (peroksi radikali) içermediğinde; (ii) doymamış lipidler gibi materyali koruma reaksiyon hızı radikallerin reaksiyon hızından çok daha fazla olmadığında; (iii) reaksiyon ürünleri zincir uzama reaksiyonunu veren türler olmadığı durumunda o bileşiğin bazı radikal türleriyle reaksiyon vermesi antioksidant olduğu anlamına gelmez.

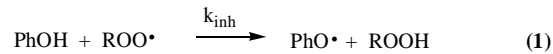
Bazı bileşikler doğrudan antioksidant özellik göstermezler örneğin, lipidlerin korunmasında model sistemlerde veya besin ürünlerinde antioksidant savunmayı artırır. Örneğin antioksidant enzimlerin aktivitesi veya ekspresyonunun artmasına neden olurlar. Böyle bileşikler indirek antioksidant olarak adlandırılırlar.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

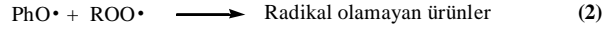
Antioksidant aktivite mekanizmasını anlamak için moleküllerin kompozisyonunu bilmek gerekir. Geniş kimyasal çeşitliğine karşı yaygın esansiyel yağların ana bileşenleri hidrokarbon ve terpen iskeletleridir. Terpenoidler; 2 (monoterpen), 3 (sesquiterpen) veya 4 (diterpen) izopren ve fenilpropanoid ünitelerinin kombinasyonundan oluşurlar. Hem terpenoidler hem de fenilpropanoidler fenolik bileşikler içerirler ve bazı yaygın yapılar aşağıdaki gibidir.



Genel olarak fenolik bileşikler ya doğal (tokoferol) yada sentetik bütillenmiş hidroksianisol (BHA) olabilirler, peroksi radikali ile yüksek reaktivitelerinden dolayı antioksidant olarak davranarak peroksi radikalini imha ederler (Eşitlik 1.).

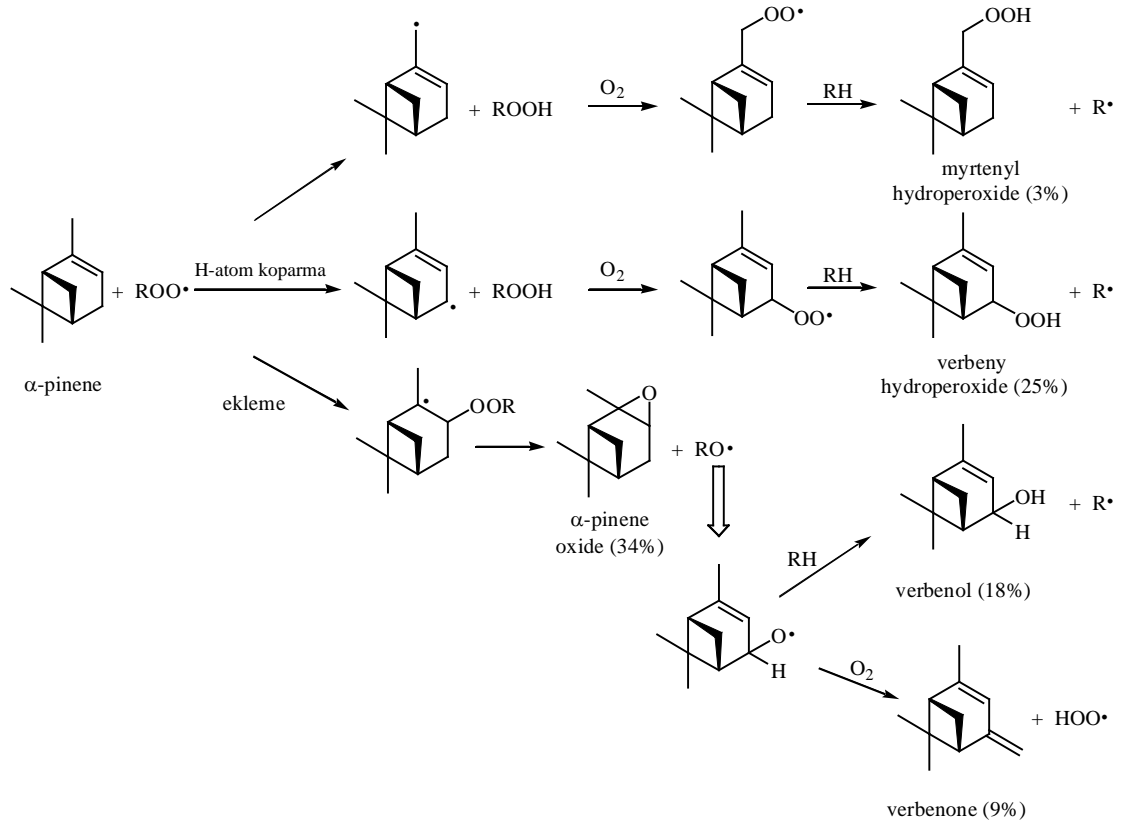


Oluşan fenoksi radikalinin kararlılığından dolayı zincir uzama reaksiyonu gerçekleşmez ama ikinci bir reaksiyon gerçekleşir; oluşan fenoksi ile peroksi radikali çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek radikallerin sönmeye neden olurlar (Eşitlik 2.)



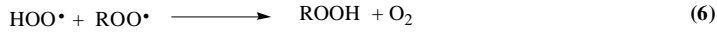
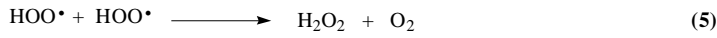
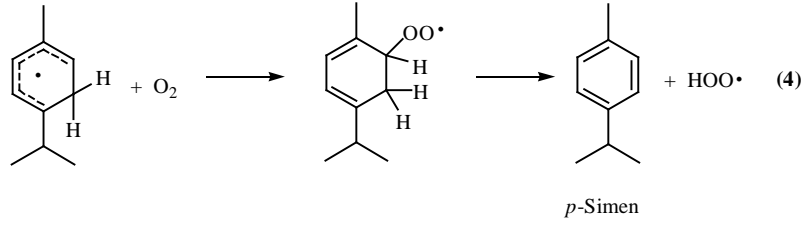
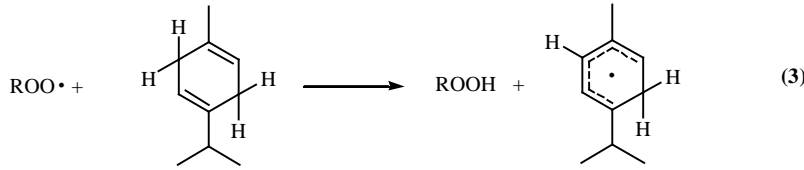
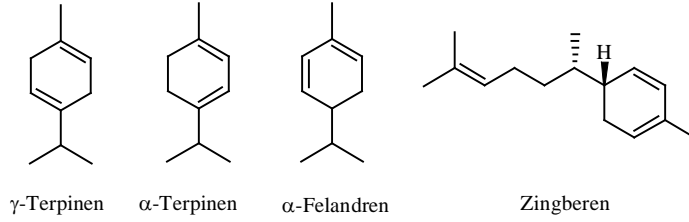
Peroksi radikallerinin (oksidatif zincirlerin) n tanesi, stoikiyometrik faktör olarak adlandırılan bir antioksidant molekülü tarafından söndürülür (n=2 gayakol ve tokoferol gibi fenoller)

Esansiyel yağların diğer bileşenleri terpenoidler peroksi radikali ile reaksiyon verebilir. Bununla birlikte reaksiyon reaktif alkil radikali verebilir (terpenin hidrokarbon iskeletinde), oksijen varlığında uzama reaksiyonu yapabilecek bir peroksi radikalini oluştururlar. Öte yandan fenolik olmayan terpenoidler aslında doymamışlardır ve doymamış lipidler gibi ootokside olabilirler. Bu süreç α -pinen molekülünün olası reaksiyon şemasında aşağıdaki şekilde gösterildiği gibidir.

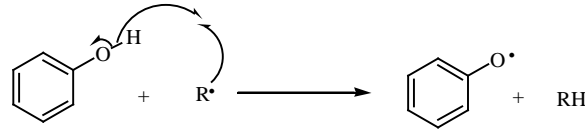


5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Terpenoidler, γ -terpinen molekülünde olduğu gibi sikloheksadien bir yapıya sahiptir. γ -terpinen esansiyel yağının antioksidant aktivitesi eşitlik 6'da belirtilmiştir.



M. longifolia bitkisinin metanol ekstraktının fenolik bileşenleri genellikle Hidrojen Atom Transferi (HAT) yaparak, serbest radikalleri etkisiz hale getirdiğini düşünmekteyiz. ArOH antioksidantı, R serbest radikali ile reaksiyona girerek, O-H bağının homolitik kırılması yoluyla bir hidrojen atomu transfer eder.



Oluşan reaksiyon ürünleri, zararsız RH türleri ve okside olmuş ArO radikalleridir. Bu reaksiyon sonucu başka bir radikal oluşumuna neden olsa bile, oluşan bu radikal R grubuna nazaran daha az reaktiftir. Çünkü bazı faktörler tarafından stabilize edilmiştir.

Sonuç olarak, *M. longifolia* bitkisinin metanol ekstraktı ve uçucu yağının, protein ve DNA'da oksidatif hasara neden olan karbon merkezli aril radikallerinin etkisini azalttığı bulundu. Bu bağlamda, *M. longifolia* bitkisinin, aromatik amin içeren ilaçları kullanan hastalarda meydana gelen agranülositoz hastalığının şiddetinde azalmaya neden olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Alexandra, R. L., Uetrecht, J., 2014. Involvement of Myeloperoxidase and NADPH Oxidase in the Covalent Binding of Amodiaquine and Clozapine to Neutrophils: Implications for Drug-Induced Agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol*, 27(4): 699-709.

Akamizu, T., Ozaki, S., Hiratani, H., Uesugi, H., Sobajima, J., Hataya, Y., Kanamoto, N., Saijo, M., Hattori, Y., Moriyama, K., Ohmori, K. and Nakao, K., 2002. Drug-Induced Neutropenia Associated with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA): Possible Involvement of Complement in Granulocyte Cytotoxicity. *Clin Exp Immunol*, 127:92-98.

Arya, D.P., 2006. Diazo and Diazonium DNA Cleavage Agents: Studies on Model Systems and Natural Products Mechanism of Action. *Top. heterocycl chemistry*, 2:129-152.

Arya, D.P., Jebaratnam, D.J., 1995. Towards the Development of Non-Enediyne Approaches for Mimicking Enediyne Chemistry: Design, Synthesis and Activity of a 1,4-bisdiazonium Compound., *Tetrahedron Letters*, 36:4369-4372.

Arya, D.P., Jebaratnam, D.J., 1995. DNA Cleaving Ability of 9-diazofluorenes and Diaryl Diazomethanes: Implication for the Mode of Action of the Kinamycin Antibiotics., *J. Org. Chem.*, 60:3268-3269.

Aster, R.H., 1999. Drug-Induced Immune Thrombocytopenia: An Overview of Pathogenesis. *Semin Hematol*, 36:2-6.

Augusto, O., Cavalier, E.L., Rogan, E.G., Ramakrishna, N.V.S., Kolar, C., 1190. Formation of 8-Methylguanine as a Result of DNA Alkylation by Methyl Radicals Generated During Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Methylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, 265: 22093

Bates, D.W., Cullen, D.J., Laird, N., Petersen, L.A., Small, S.D., Servi, D., Laffel, G., Sweitzer, B.J., Shea, B.F., Hallisey, R., and et al., 1995. Incidence of Adverse Drug Events and Potential Adverse Drug Events. Implications for Prevention. ADE Prevention Study Group. *Jama*, 274:29-34.

Beaune, P.H. and Lecoer, S., 1997. Immunotoxicology of the Liver: Adverse Reactions to Drugs. *J. Hepatol 26 Suppl*, 2:37-42.

Behr, J.P., 1989. Photohydrolysis of DNA by Polyaminobenzenediazonium salts. *J. Chem.Soc, Chem Commu.*, 101.

Bigby, M., Jick, S., Jick, H. and Arndt, K., 1986. Drug-Induced Cutaneous Reactions. A Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 Consecutive Inpatients, 1975 to 1982. *Jama*, 256:3358-3363.

Blanca, M., 2008. Editorial: T Cell Effector Responses to Drugs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 8:287-288.

Bregant, T.M., Groppe, J., Little, D.R., 1994. New Class of DNA-Cleaving Agents Based on Trimethylenemethane. *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 3635.

Bryant, A.E., 3rd and Dreifuss, F.E., 1996. Valproic Acid Hepatic Fatalities. III. U.S. experience since 1986. *Neurology*, 46:465-469.

Cai, YZ., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sci.*, 74: 2157-2184.

Classen, D.C., Pestotnik, S.L., Evans, R.S., Lloyd, J.F and Burke JP., 1997. Adverse Drug Events in Hospitalized Patients. Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality. *Jama*, 277:301-306.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., 2001. Organic Chemistry. Oxford University Press, New York, USA.

Clare, L. Hawkins., Michael, J. Davies., 2001. Generation and Propagation of Radical Reactions on Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504:196-219

Choi, H.K., Merkel, P.A. and Niles, J.L., 1998. ANCA-Positive Vasculitis Associated with Allopurinol Therapy. *Clin Exp Rheumatol*, 16:743-744.

Colas, C., Goeldner, M., 1999. An Efficient Procedure for the Synthesis of Crystalline Aryldiazonium Trifluoroacetates-Synthetic Application, *Eur. J. Org. Chem*, 1357-1366.

Cui, D., Rankin, G.O. and Harvison, P.J., 2005. Metabolism of the Nephrotoxicant N-(3,5-dichlorophenyl)succinimide in Rats: Evidence for Bioactivation Through Alcohol-Oglucuronidation and O-sulfation. *Chem Res Toxicol*, 18:991-1003.

Çeken, B., Kızıl, M., 2007. Synthesis and DNA-Cleaving Activity of a Series of Substituted Arenediazonium ions. *Russ. J. Bioorg. Chem*, 34: 488-498.

Fibbe, W.E., Claas, F.H., Van der Star-Dijkstra, W., Schaafsma, M.R., Meyboom, R.H. and Falkenburg, J.H., 1986. Agranulocytosis Induced by Propylthiouracil: Evidence of a Drug Dependent Antibody Reacting with Granulocytes, Monocytes and Haematopoietic Progenitor Cells. *Br J Haematol*, 64:363-373.

Fieser, L.F., 1938. Carcinogenic Activity, Structure, and Chemical Reactivity of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Am. J. Cancer*, 34:37-124.

Gardner, I., Leeder, J.S., Chin, T., Zahid, N. and Uetrecht, J.P., 1998a. A Comparison of the Covalent Binding of Clozapine and Olanzapine to Human Neutrophils *in vitro* and *in vivo*. *Mol Pharmacol*, 53:999-1008.

Glatt, H., Engelke, C.E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A.L., Coughtrie, M.W., Andrae, U., Falany, C.N. and Meinl W., 2000. Sulfotransferases: Genetics and Role in Toxicology. *Toxicol Lett*, 112-113:341-348.

Guest, I., Sokoluk, B., MacCrimmon, J. and Uetrecht, J., 1998. Examination of Possible Toxic and Immune Mechanisms of Clozapine-Induced Agranulocytosis. *Toxicology*, 131:53-65.

Gülçin, İ., Büyükkuroğlu, ME., Küfrevioğlu, Öİ. 2003a. Metal Chelating and Hydrogen Peroxide Scavenging Effects of Melatonin. *J Pineal Res*, 34: 278-281.

Hargus, S.J., Amouzedeh, H.R., Pumford, N.R., Myers, T.G., McCoy, S.C. and Pohl, L.R., 1994. Metabolic Activation and Immunochemical Localization of Liver Protein Adducts of the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Diclofenac. *Chem Res Toxicol*, 7:575-582.

Harris, H.E. and Raucchi, A., 2006. Alarmin(g) News About Danger: Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1. *EMBO Rep*, 7:774-778.

Hertl, M. and Merk, H.F., 1995. Lymphocyte Activation in Cutaneous Drug Reactions. *J. Invest Dermatol*, 105:95S-98S.

Hiramoto, K., Inoue, M., Maeda, K., Kato, T., Kikugawa, K., 1994. Generation of a Carbon-Centered Radical with DNA-Breaking Activity from Mutagenic Fluorine-2-diazonium salt., *Pharma. Soc. of Japan.*, 40:414-421.

Hiramoto, K., Kaku, M., Sueyoshi, A., Fujise, M., Kikugawa, K., 1995. DNA Base and Deoxyribose Modification by the Carbon-Centered Radical Generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, a Carcinogen in Mushroom., *Chem. Res. Toxicol.*, 8:356-362.

Hiramoto, K., Yasuhara, Y., Sako, K., Aoki, K., Kikugawa, K., 2003. Suppression of Free Radical-Induced DNA Strand Breaks by Linoleic Acid and Low Density Lipoprotein *in vitro.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 26(8):1129-1134.

Horvathova, E., Navarova, J., Galova, E., Sevcovicova, A., Chodakova, L., Snahnicanova, Z., Melusova, M., Kozics, K., Slamenova, D. 2014. Assessment of Antioxidative, Chelating, and DNA-Protective Effects of Selected Essential Oil Components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of Plants and Intact *Rosmarinus Officinalis* oil. *J. Agr. Food Chem.*, dx.doi.org/10.1021/jf501006y.

6. KAYNAKLAR

Ikehata, K., Duzhak, T.G., Galeva, N.A., Ji, T., Koen, Y.M. and Hanzlik, R.P., 2008. Protein Targets of Reactive Metabolites of Thiobenzamide in Rat Liver *in vivo*. *Chem Res Toxicol*, 21:1432-1442.

Jebaratnam, D.J., Arya, D.P., 1995. A Single Precursor Approach to New DNA Cleaving and Crosslinking Agents., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:1191-1196.

Jick, H., 1984. Adverse Drug Reactions: the Magnitude of the Problem. *J Allergy Clin Immun.*, 74:555-557.

Jones, G.B., Fouad, F.S., 2002. Designed Eneidyne Antitumor Agents. *Curr Pharm Desing*, 8: 2415-2440.

Kalgutkar, A.S. and Soglia, J.R., 2005. Minimising the Potential for Metabolic Activation in Drug Discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1:91-142.

Karaman, S., Tütem, E., Başkan, KS., Apak, R. 2009. Comparison of Total Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Some Apple Juices with Combined HPLC-CUPRAC Assay. *Food Chem*, 120: 1201-1209.

Kubow, S. and Wells, P.G., 1989. *In vitro* Bioactivation of Phenytoin to a Reactive Free Radical Intermediate by Prostaglandin Synthetase, Horseradish Peroxidase, and Thyroid Peroxidase. *Mol Pharmacol*, 35:504-511.

Kızıl, M., Yılmaz, E. İ., Pirinççioğlu, N., Aytekin, Ç., 2003. DNA Cleavage Activity of Diazonium Salts: Chemical Nucleases. *Turk J. Chem.* 27: 539-544.

Lazarou, J., Pomeranz, B.H and Corey, P.N., 1998. Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients: a Meta-Analysis of Prospective Studies. *Jama*, 279:1200-1205.

Landsteiner, K., Jacobs, J., 1935. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J. Exp Med.*, 61:643-656.

Lecoeur, S., Andre, C. and Beaune, P.H., 1996. Tienilic Acid-Induced Autoimmune Hepatitis: Anti-Liver and Kidney Microsomal Type 2 Autoantibodies Recognize a Three-Site Conformational Epitope on Cytochrome P4502C9. *Mol Pharmacol*, 50:326-333.

Leite, L.C.C., Augusto, O., 1989. *Arch Biochem Biophys*, 270:560.

Li, C., Benet, L.Z. and Grillo, M.P., 2002. Studies on the Chemical Reactivity of 2-phenylpropionic acid 1-O-acyl Glucuronide and S-acyl-CoA Thioester Metabolites. *Chem Res Toxicol*, 15:1309-1317.

- Marchesi, C., Painsi, M., Tamborini, S., Ampollini, P. and Maggini, C., 2005. Recurrence of Clozapine-Induced Agranulocytosis. *J Clin Psychopharm.*, 25:276-277.
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol*, 12:991-1045.
- Merkel, P.A., 1998. Drugs Associated with Vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*, 10:45-50.
- Michael, D., 2012. Free Radicals, Oxidants and Protein Damage. *Showcase on Research*, 43:8-12.
- Miller, E.C., Miller, J.A., 1947. The Presence and Significance of Bound Aminoazo Dyes in the Livers of Rats Fed p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*, 7:468-480.
- Moeschlin, S. and Wagner, K., 1952. [Agranulocytosis due to the Occurrence of Leukocyteagglutinins; Pyramidon and Cold Agglutinins.]. *Acta Haematol*, 8:29-41.
- Mukhtar, H. and Khan, W.A., 1989. Cutaneous Cytochrome P-450. *Drug Metab Rev*, 20:657-673.
- Narwaley, M., Michail, K., Arvadia, P., Siraki, A.G., 2011. Drug-Induced Protein Free Radical Formation is Attenuated by Unsaturated Fatty Acids by Scavenging Drug-Derived Phenyl Radical Metabolites., *Chem. Res. Toxicol.*, 24:1031-1039.
- Naqvi, S., Ullah, M.F., Hadi, M.S., 2010. DNA Degration by Aqueous Extract of Aloe Vera in the Presence of Copper ions. *Indian J. Biochem & Bio.*, 47: 161-165.
- Nelson, S.D., 1982. Metabolic Activation and Drug Toxicity. *J Med Chem*, 25:753-765.
- Nicolaou, K.C., Skokotas, G., Maligres, P., Zuccarello, G., Schweiger, E.J., Toshima, K., Wendeborn, S., 1989. A New Class of DNA-Cleaving Molecucls-Ph-Dependent DNA Cleavage by Propargylic and Allenic Sulfones. *Angew Chem. Int. Edit.*, 28: 1272-1275.
- Nicolaou, K.C., Maligres, P., Shin, J., Leon, E.D., Rideout, D., 1990. DNA Cleavage and Antitumor-Activity of Designed Molecules with Conjugated Phosphine Oxide-allene-ene-yne Functionalities. *Angew Chem. Int. Edit.*, 12: 7825-7826.
- Nicolaou, K.C., Zuccarello, G., Reimer, C., Estevez, V.A., Dair, W.M., 1992. Desing, Synthesis, and Study of Simple Monocyclic Conjugated Eneidyne: The 10-Membered Ring Eneidyne Moitety of the Eneidyne Anticancer Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7360.
- Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Öİ. 2003. Determiation of *in vitro* Antioxidant Activity of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Extracts. *Lebensm Wiss Technol*, 36: 263-271.

Öztürk Sarıkaya, SB., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ., Supuran, CT. 2001. *In vitro* Inhibition of a-carbonic Anhydrase Isozymes by Some Phenolic Compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 4259-4262.

Pannatier, A., Jenner, P., Testa, B. and Etter, J.C., 1978. The Skin as a Drug-Metabolizing Organ. *Drug Metab Rev*, 8:319-343.

Park, B.K., Pirmohamed, M. and Kitteringham, N.R., 1992. Idiosyncratic Drug Reactions: A Mechanistic Evaluation of Risk Factors. *Br J Clin Pharmacol*, 34:377-395.

Parker, C.W., Shapiro, J., Kern, M. and Eisen, H.N., 1962. Hypersensitivity to Penicillenic Acid Derivatives in Human beings with Penicillin Allergy. *J Exp Med*, 115:821-838.

Patterson, R., 1984. Early Recognition of Allergic Reactions to New Drugs. *J Allergy Clin Immunol*, 74:641-642.

Pichler, W.J., 2002. Pharmacological Interaction of Drugs with Antigen-Specific Immune Receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2:301-305

Pine, S.H., 1987. *Organic chemistry, 5th ed.* McGraw-Hill, p. 374-375, New York

Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R. and Park, B.K., 1994. The Role of Active Metabolites in Drug Toxicity. *Drug Saf*, 11:114-144.

Quintero, B., Miranda, M.A., 2000. Mechanisms of Photosensitization Induced by Drugs: A General Survey. *Ars. Pharmaceutica*, 41:27-46.

Reszka, J.K., Chignell, C.F., 1995. One-Electron Reduction of Arenediazonium Compounds by Physiological Electron Donors Generates Aryl Radicals. An EPR and Spin Trapping Investigation., *Chem. Biol. Interact.*, 96:223-234.

Richardson, B., 2003. DNA Methylation and Autoimmune Disease. *Clin Immunol*, 109:72-79.

Roujeau, J.C, Kelly, J.P., Naldi, L., Rzany, B., Stern, R.S., Anderson, T., Auquier, A., Bastuji-Garin, S., Correia, O., Locati, F. and et al. 1995. Medication Use and The Risk of Stevens-Johnson Syndrome or Toxic Epidermal Necrolysis. *N Engl J Med*, 333:1600-1607.

Rothman, I.K. and Amorosi, E.L., 1979. Procainamide-Induced Agranulocytosis and Thrombocytopenia. *Arch Intern Med*, 139:246-247.

Safferman, A.Z., Lieberman, J.A., Alvir, J.M and Howard, A., 1992. Rechallenge in Clozapine Induced Agranulocytosis. *Lancet*, 339:1296-1297.

Seguin, B. and Uetrecht, J., 2003. The Danger Hypothesis Applied to Idiosyncratic Drug Reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3:235-242.

Seong, S.Y. and Matzinger, P., 2004. Hydrophobicity: An Ancient Damage-Associated Molecular Pattern That Initiates Innate Immune Responses. *Nat Rev Immunol*, 4:469-478.

Scheinberg, P., Wu, C.O., Nunez, O. and Young, N.S., 2008. Long-Term Outcome of Pediatric Patients with Severe Aplastic Anemia Treated with Antithymocyte Globulin and Cyclosporine. *J Pediatr*, 153:814-819.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158.

Siraki, A.G., Bonini, M.G., Jiang, J., Ehrenshaft, M., Mason, R.P., 2007. Aminoglutethimide-Induced Protein Free Radical Formation on Myeloperoxidase: A Potential Mechanism of Agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol*, 20:1038-1045.

Siraki, A.G., Deterding, L.J., Bonini, M.G., Jiang, J., Ehrenshaft, M., Tomer, K.B., Mason, R.P., 2008. Procainamide, But not N-Acetylprocainamide, Induces Protein Free Radical Formation on Myeloperoxidase: A Potential Mechanism of Agranulocytosis. *Chem. Res. Toxicol*, 21:1143-1153.

Smith, M.T., 2003. Mechanisms of Troglitazone Hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 16:679-687.

Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuan, L., Li, H.B. 2010. Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *Int J Mol Sci*, 11:2362-2372.

Stock, M., Ming-Hong Hung., 1982. Reactions of Benzenediazonium Ions with Guanine and Its Derivates. *J.Org. Chem*, 47:448-453.

Stingl, G., Gazze-Stingl, L.A., Aberer, W. and Wolff, K., 1981. Antigen Presentation by Murine Epidermal Langerhans Cells and Its Alteration by Ultraviolet B Light. *J. Immunol*, 127:1707-1713.

Sullivan, R.W.C., Coghlan, V.M., Munk, S.A., Reed, M.W., Moore, H.W., 1994. DNA Cleavage by 4-alkynyl-3-methoxy-4-hydroxycyclobutenones. *J. Org. Chem*, 59:2276-2278.

Sun, Q., Zhu, R., Foss, F.W., Jr. and Macdonald., 2008. *In vitro* Metabolism of a Model Cyclopropylamine to Reactive Intermediate: Insights into Trovafloxacin-Induced Hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 21:711-719.

Svensson, C.K., 2009. Biotransformation of Drugs in Human Skin. *Drug Metab Dispos*, 37:247-253.

Tafazoli, S. and O'Brien, P.J., 2005. Peroxidases: A Role in The Metabolism and Side Effects of Drugs. *Drug Discov Today*, 10:617-625.

Tafazoli, S., Spehar, D.D. and O'Brien, P.J., 2005. Oxidative Stress Mediated Idiosyncratic Drug Toxicity. *Drug Metab Rev*, 37:311-325.

Tang, W. and Abbott, F.S., 1996. Characterization of Thiol-Conjugated Metabolites of 2-propylpent-4-enoic Acid (4-ene VPA), a Toxic Metabolite of Valproic Acid, by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*, 31:926-936.

Tarazi, E.M., Harter, J.G., Zimmerman, H.J, Ishak, K.G. and Eaton, R.A., 1993. Sulindac-associated Hepatic Injury: Analysis of 91 Cases Reported to The Food and Drug Administration. *Gastroenterology*, 104:569-574.

Tullius, T.D., Pogorzelski, W.K., 1998. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from Sugar Moiety. *Chem. Rev*, 98:1089-1107.

Uetrecht, J.P. and Woosley, R.L., 1981. Acetylator Phenotype and Lupus Erythematosus. *Clin Pharmacokinet*, 6:118-134.

Uetrecht, J.P., 1988. Mechanism of Drug-Induced Lupus. *Chem Res Toxicol*, 1:133-143.

Uetrecht, J., 1990. Drug Metabolism by Leukocytes and Its Role in Drug-Induced Lupus and Other Idiosyncratic Drug Reactions. *Crit Rev Toxicol*, 20:213-235.

Uetrecht, J.P., 1992. The Role of Leukocyte-Generated Reactive Metabolites in The Pathogenesis of Idiosyncratic Drug Reactions. *Drug Metab Rev*, 24:299-366.

Uetrecht, J.P., 1999. New Concepts in Immunology Relevant to Idiosyncratic Drug Reactions: The "Danger Hypothesis" and Innate Immune System. *Chem Res Toxicol*, 12:387-395.

Uetrecht, J., 2005. Current Trends in Drug-Induced Autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 4:309-314.

Uetrecht, J., 2007a. Idiosyncratic Drug Reactions: Current Understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:513-539.

Uetrecht, J.P., Trager, W., 2007b. Drug Metabolism: Chemical and Enzymatic Aspects. *Informa Healthcare*, New York, USA.

Vergani, D., Mieli-Vergani, G., Alberti, A., Neuberger, J., Eddleston, A.L., Davis, M. and Williams, R., 1980. Antibodies to The Surface of Halothane-Altered Rabbit Hepatocytes in Patients with Severe Halothane-Associated Hepatitis. *N Engl J Med*, 303:66-71.

Warner, P.M., Qi, J., Meng, B., Li, G., Xie, L., El-Shafey, A., Jones, G.B., 2002. DNA Cleavage by Aromatic Amines., *Bio. Med. Chem. Lett.*, 12:1-4.

Warkentin, T.E. and Kelton, J.G., 2001. Temporal Aspects of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 344:1286-1292.

Warkentin, T.E., 2003. Heparin-Induced Thrombocytopenia: Pathogenesis and Management. *Br J Haematol*, 121:535-555.

Ware, J.A., Graf, M.L., Martin, B.M., Lustberg, L.R. and Pohl, L.R., 1998. Immunochemical Detection and Identification of Protein Adducts of Diclofenac in The Small Intestine of Rats: Possible Role in Allergic Reactions. *Chem Res Toxicol*, 11:164-171.

Woosley, R.L., Drayer, D.E., Reidenberg, M.M., Nies, A.S., Carr, K. and Oates, J.A., 1978. Effect of Acetylator Phenotype on The Rate at Which Procainamide Induces Antinuclear Antibodies and The Lupus Syndrome. *N Engl J Med*, 298:1157-1159.

Wojtunik, K.A., Ciesla, L.M., Waksmundzka-Hajnos, M., 2014. Model Studies on The Antioxidant Activity of Common Terpenoid Constituents of Essential Oils by Means of The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Method. *Agr food chem*, dx.doi.org/10.1021/jf50285s.

Young, N. and Alter, B.P., 1994. Aplastic Anemia: Acquired and Inherited. W.B. Saunders company, London.

Zimmerman, H.J., 1993. *Hepatotoxicity. Dis Mon*, 39:675-787.

Zollinger, H., 1994. Diazo Chemistry: Aromatic and Heteroaromatic Compounds., Wiley: vol:1, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Veysel GÜZEL
Doğum Tarihi : 01.08.1986
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri : Merkez/BATMAN
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280-Diyarbakır
E-Mail : veyselg72@gmail.com

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1992-Haziran 2004

İlkokul ve ortaokul öğrenimimi Ziya Gökalp İlköğretim okulunda ve Lise eğitimimi Batman Lisesinde tamamladım.

Eylül 2006-Temmuz 2011

Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünü (İngilizce hazırlıklı) bitirdim.

Eylül 2012-Mevcut Tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında “ **Aromatik Amin İlaçların Reaktif Metabolitlerinin Proteinlerde Oluşturduğu Hasara Karşı, *Mentha Longifolia* Bitkisinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması** ” adlı master tezini Prof. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında bitirdim.