



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OKSİDATİF STRES SONUCU
OLUŞAN DNA HASARLARI VE ZEYTİNYAĞININ
KORUYUCU ETKİSİ**

**Özlem EROL DAYI
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Nazlı ARDA**

**İkinci Danışman
Prof. Dr. Günhan ERDEM**

Mart, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OKSİDATİF STRES SONUCU
OLUŞAN DNA HASARLARI VE ZEYTİNYAĞININ
KORUYUCU ETKİSİ**

Özlem EROL DAYI
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Nazlı ARDA

İkinci Danışman
Prof. Dr. Günhan ERDEM

Mart, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 08/03/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN
Marmara Üniversitesi

Bu alışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü
Sekreterliğinin 2007/69 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca her konuda desteğini hissettiğim, kişisel ve bilimsel gelişimime büyük katkılar sağlayan değerli Hocam Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışmaya yaptığı tüm katkılardan dolayı Prof. Dr. Günhan ERDEM'e,

Tez çalışmamın şekillenmesinde bilgi, deneyim ve önerileri ile büyük katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. A. Süha YALÇIN ve Prof. Dr. Şule ARI'ya,

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve destekleri ile katkıda bulunan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen tüm araştırmacı ve arkadaşlarıma, özellikle sevgili dostlarım Dr. Neslihan Turgut-Kara ve Dr. Evren Önay-Uçar'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımı şekillendirirken aldığım tüm kararlarda beni destekleyen ve her zaman yanımda olan Sevgili AİLEM'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İstanbul, 2010

Özlem EROL DAYI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	6
2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	7
2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası ve Özellikleri.....	8
2.1.2.1. Süperoksit Anyonu (O_2^-).....	8
2.1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	9
2.1.2.3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot).....	10
2.1.2.4. Hipoklorik Asit ($HOCl$).....	10
2.2. OKSİDATİF HASARA UĞRAYAN HÜCRESEL YAPITAŞLARI.....	11
2.2.1. Zar Lipitleri.....	11
2.2.2. Proteinler.....	11
2.2.3. DNA.....	12
2.2.3.1. Oksidatif DNA Hasarının Biyolojik Sonuçları.....	16
2.2.3.2. APEX Gen Bölgesi ve Önemi.....	17
2.2.3.3. β -globin Gen Kümesi ve Nükleer DNA Hasarı.....	18
2.2.3.4. Oksidatif Streste Mitokondriyal DNA.....	19
2.2.3.5. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi.....	21
2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNE KARŞI SAVUNMA MEKANİZMALARI.....	23
2.3.1. Antioksidanlar.....	23

2.3.1.1. Antioksidan Enzimler.....	24
2.3.1.2. Zincir Kıran Antioksidanlar.....	25
2.3.1.3. Metal Bağlayan Proteinler.....	28
2.3.2. Onarım Sistemleri.....	28
2.3.2.1. DNA Onarım Sistemleri.....	28
2.3.2.2. Proteinlerin Onarımı.....	31
2.4. OKSİDATİF STRES VE APOPTOZ.....	32
2.5. DOĞAL ANTIOKSİDANLAR VE ZEYTİNYAĞININ BİYOLOJİK ETKİLERİ.....	34
2.6. HeLa (SERVİKS ADENOKARSİNOMA) HÜCRELERİ.....	38
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	40
3.1. HeLa HÜCRELERİNİN KÜLTÜRLEME KOŞULLARI.....	40
3.2. HeLa HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI.....	41
3.3. ZEYTİNYAĞI FENOLİK FRAKSİYONUNUN ELDE EDİLMESİ VE FENOLİK MADDE MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	42
3.4. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	43
3.4.1. Zeytinyağı Fenolik Fraksiyonunun Sitotoksosite Analizi.....	44
3.4.2. Gallik Asitin Sitotoksosite Analizi.....	44
3.4.3 Hidrojen Peroksitin Sitotoksosite Analizi.....	45
3.4.3.1. Besiyerinde Kalan H ₂ O ₂ Derişiminin Belirlenmesi.....	45
3.5. HÜCRE İÇİ ROT DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ.....	46
3.6. DNA HASARININ BELİRLENMESİ.....	47
3.6.1. DNA İzolasyonu.....	48
3.6.2. QPCR Primerlerinin Tasarımı.....	49
3.6.3. QPCR Analizi.....	50
3.6.3.1. QPCR Optimizasyonu.....	50
3.6.3.2. QPCR Ürün Miktarlarının ve DNA Hasar Frekanslarının Belirlenmesi.....	52
3.6.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	53
3.7. ENZİMATİK ANALİZLER.....	54
3.7.1. Kaspaz 9 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	54
3.7.2. Sitokrom C Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	56
3.7.3. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	57
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	57

3.9. TOPLU DENEY ÇİZELGESİ.....	58
4. BULGULAR.....	60
4.1. HeLa HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ.....	60
4.2. ZEYTİNYAĞI FENOLİK FRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE MİKTARI.....	60
4.3. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ.....	61
4.3.1. Zeytinyağı Fenolik Fraksiyonunun Sitotoksik Etkisi.....	61
4.3.2. Gallik Asitin Sitotoksik Etkisi.....	62
4.3.3. Hidrojen Peroksitin Sitotoksik Etkisi.....	63
4.3.3.1. Besiyerinde Kalan H_2O_2 Derişimi.....	63
4.5. HÜCRE İÇİ ROT DÜZEYİ.....	66
4.6. DNA HASARI.....	67
4.6.1. DNA İzolasyonu.....	67
4.6.2. QPCR Optimizasyonu.....	67
4.6.3. QPCR Analizi.....	73
4.7. ENZİMATİK ANALİZLER.....	75
4.7.1. Kaspaz 9 Aktivitesi.....	75
4.7.2. Sitokrom C Oksidaz Enzim Aktivitesi.....	77
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	ETZ’nde elektron ve protonların hareketi ile $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 oluşumu.....	8
Şekil 2.2	DNA’da en çok görülen oksidatif baz hasarları.....	13
Şekil 2.3	OH radikalının oluşturduğu bazı ürünler.....	14
Şekil 2.4	DNA’da en çok görülen oksidatif şeker hasarları.....	15
Şekil 2.5	DNA’da meydana gelen oksidatif hasarların toplu gösterimi.....	16
Şekil 2.6	DNA hasarının sonuçları	17
Şekil 2.7	APEX proteininin organizasyonu.....	18
Şekil 2.8	Mitokondrinin yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıklardaki rolü.....	20
Şekil 2.9	Sitokrom c oksidaz enziminin altbirimlerini şifreleyen genlerin (COX genleri) mitokondri genomundaki yerleşim düzeni.....	21
Şekil 2.10	Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin)’un kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.11	C vitamininin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.12	E vitamininin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.13	Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları	27
Şekil 2.14	Ubikinonun ubikinole indirgenmesi	27
Şekil 2.15	Baz kesip-çıkarma onarımı’nın mekanizması.....	31
Şekil 2.16	Mitokondri bağımlı iç yolağın işleyişi.....	33
Şekil 3.1	HeLa hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altındaki görüntüsü.....	41
Şekil 3.2	Deneysel çalışmaların şematik gösterimi.....	59
Şekil 4.1	HeLa hücrelerinin yarı-logaritmik çoğalma eğrisi.....	60
Şekil 4.2	Gallik asit standart grafiği.....	61
Şekil 4.3	4, 24 ve 48 saat ZFF uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	62
Şekil 4.4	4, 24 ve 48 saat GA uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	62
Şekil 4.5	10, 30 ve 60 dakika H_2O_2 uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	63
Şekil 4.6	Besiyerinde kalan H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılan fenol kırmızı yönteminde gözlenen renk değişimleri.....	64
Şekil 4.7	H_2O_2 standart grafiği.....	64
Şekil 4.8	50 μM H_2O_2 uygulamasında zamana bağlı olarak besiyerindeki H_2O_2 derişimindeki değişim.....	65
Şekil 4.9	100 μM H_2O_2 uygulamasında zamana bağlı olarak besiyerindeki H_2O_2 derişimindeki değişimi.....	65
Şekil 4.10	750 μM H_2O_2 uygulanmış HeLa hücrelerinden ($\sim 3 \times 10^6$) izole edilen DNA örnekleri.....	67
Şekil 4.11	APEX genine ait 2082 bç’lik (APEX-U) dizinin 20, 22, 24, 26, 28 ve 30 döngülük PCR’ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü.....	68

Şekil 4.12	APEX genine ait 180 bç'lik (APEX-K) dizinin 20, 22, 24, 26, 28 ve 30 dögülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü	68
Şekil 4.13	β -globin gen kümesine ait 2334 bç'lik (BETA) dizinin 20, 22, 24, 26, 28 ve 30 dögülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.14	mtDNA'ya ait 2232 bç'lik (COX-U) dizinin 10, 12, 14, 16 ve 18 dögülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.15	mtDNA'ya ait 161 bç'lik (COX-K) dizinin 12, 14, 16, 18, 20 ve 22 dögülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.16	APEX genine ait 2082 bç'lik (APEX-U) dizinin 50 μ l reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 27 dögülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.17	APEX genine ait 180 bç'lik (APEX-K) dizinin 50 μ l reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 25 dögülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.18	β -globin gen kümesine ait 2334 bç'lik (BETA) dizinin 50 μ l reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 27 dögülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.19	mtDNA'ya ait 2232 bç'lik (COX-U) dizinin 50 μ l reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 16 dögülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.20	mtDNA'ya ait 161 bç'lik (COX-K) dizinin 50 μ l reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 18 dögülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.21	APEX-U dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağıl PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lık dizi başına hasar.....	73
Şekil 4.22	BETA dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağıl PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lık dizi başına hasar.....	74
Şekil 4.23	COX-U dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağıl PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lık dizi başına hasar.....	74
Şekil 4.24	750 μ M H ₂ O ₂ uygulanmış HeLa hücrelerinde farklı gen bölgelerine ait hasar frekanslarının karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.25	750 μ M H ₂ O ₂ uygulaması sonrasında 5, 15, 23 ve 47 saat normal kültür koşullarında inkübe edilen hücrelerin bağıl kaspaz 9 aktivitesi.....	76
Şekil 4.26	Bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi A) 4 saat ZFF veya GA ile uygulama yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi B) 4 saat ZFF veya GA ile ön uygulama ve 750 μ M H ₂ O ₂ uygulaması yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi.....	77
Şekil 4.27	Bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi A) 4 saat ZFF veya GA ile uygulama yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi B) 4 saat ZFF veya GA ile ön uygulama ve 750 μ M H ₂ O ₂ uygulaması yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi.....	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Farklı hücre tiplerinde çeşitli zeytinyağı bileşenlerinin oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri.	3
Tablo 2.1	Hücre içi temel reaktif oksijen türleri	6
Tablo 2.2	ROT tarafından oluşturulan tipik pirimidin hasarları ve biyolojik sonuçları.....	14
Tablo 2.3	Zeytinyağının kimyasal bileşimi.....	35
Tablo 3.1	DNA izolasyonu öncesinde HeLa hücrelerine yapılan uygulamalar.....	48
Tablo 3.2	Optimizasyon çalışmaları sırasında denenen PCR bileşenlerinin derişim ve miktarları.....	51
Tablo 3.3	QPCR’da kullanılan bileşenlerin; marka, kod ve son derişimleri.....	51
Tablo 3.4	APEX geninde 2082 ve 180 bç’lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.....	52
Tablo 3.5	β globin gen kümesinde 2334 bç’lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.....	52
Tablo 3.6	mtDNA’da 2232 ve 161 bç’lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.....	52
Tablo 3.7	Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yürütme tampon çözeltisinin içeriği	54
Tablo 4.1	95 μ g/ml ZFF veya 28 μ g/ml GA uygulanmış HeLa hücrelerindeki bağıl hücre içi ROT miktarları.....	66
Tablo 4.2	95 μ g/ml ZFF veya 28 μ g/ml GA uygulamalarından sonra 200 μ M H ₂ O ₂ ile 1 saat işleme sokulmuş HeLa hücrelerindeki bağıl hücre içi ROT miktarları.....	66

SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ

5'dRP	: 5'-Deoksiriboz-5-fosfat
8-oxodG	: 8-Hidroksideoksiguanozin
8-oxoG	: 8-Hidroksiguanozin
ALS	: Amiyotropik lateral sklerozis
ANOVA	: Varyans analizi ("analysis of variance")
APEX	: Apürinik/apirimidinik endonükleaz
BCA	: Bişinkoninik asit ("Bicinchoninic acid")
BER	: Baz kesip-çıkarma onarımı ("Base Excision Repair")
BHT	: Bütilhidroksitoluen
BSA	: Sığır serum albumini ("Bovine Serum Albumin")
CAT	: Katalaz
COMET	: Tek hücre jel elektroforezi
COX	: Sitokrom c oksidaz altbirim genleri
Cu/Zn-SOD	: Bakır/çinko-süperoksit dismutaz (sitozolik)
DCFDA	: 2',7'-Diklorofluoresin diasetat
DCFH	: Diklorofluoresin
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DISC	: Ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (Death inducing signal complex)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Dox	: Doksorubisin
DR4	: Ölüm reseptörü 4 (Death receptor 4)
DR5	: Ölüm reseptörü 5 (Death receptor 5)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
EtOH	: Etil alkol
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
FBS	: Fetal sığır serumu ("Fetal Bovine Serum")
FEN1	: Kanat endonükleaz 1 ("Flap endonuclease 1")
GA	: Gallik asit
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (“Gas Chromatography-Mass Spectromerty”)
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HBSS	: “Hank’s Balanced Salt Solution”
HeLa	: Epitel kökenli serviks adenokarsinoma hücreleri
HO ₂ •	: Hidroperoksil radikali
HOCl	: Hipoklorik asit

HPLC-MS	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi ("High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectromerty")
HPRT	: Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
HPV-18	: İnsan papilloma virüs 18 (Human papilloma virus 18)
HRP	: Yaban turbu peroksidazı (Horseradish peroxidase)
IC ₅₀	: Canlı hücre sayısını %50 düşüren derişim ("Inhibition concentration 50%")
KCl	: Potasyum klorür
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi ("Liquid Chromatography-Mass Spectromerty")
LEHD-AFC	: 7-Amino-4-triflorometil kumarin
MDA	: Malondialdehit
MEM	: Minimum temel besiyeri ("Minimum Essential Medium")
MeOH	: Metanol
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MGMT	: O ⁶ -Metilguanin DNA metiltransferaz
Mn-SOD	: Mangan-süperoksit dismutaz (mitokondriyal)
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
nDNA	: Nükleer DNA
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaAc	: Sodyum asetat
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi ("National Center for Biotechnology Information")
NER	: Nükleotid kesip çıkarma onarımı ("Nucleotide Excision Repair")
NO	: Nitrik oksit
NQO	: Nitrokuinolin
N-ras	: Nöroblastoma ras onkogeni
O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
O ₃	: Ozon
OCl ⁻	: Hipoklorür iyonu
OH [•]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
PARP-1	: Poli(ADP-riboz) polimeraz-1
PBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponu ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline")
PCNA	: Prolifere edici hücre nükleer antijeni ("Proliferating Cell Nuclear Antigen")
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Quantitative Polymerase Chain Reaction")
Polε	: DNA polimeraz ε
Polδ	: DNA polimeraz δ
Polβ	: DNA polimeraz β
Prx	: Peroksiredoksinler

PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri (“Poly Unsaturated Fatty Acids”)
QPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Quantitative Polymerase Chain Reaction”)
RAT	: Reaktif azot türleri
RF-C	: Replikasyon faktörü C
RO [•]	: Alkoksil radikali
RO ₂ [•]	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Süperoksit redüktaz
TAE	: Tris-asetat tamponu
t-BOOH	: Tert-bütilhidroperoksit
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü (“Tumor necrosis factors receptor”)
ZFF	: Zeytinyağı fenolik fraksiyonu

ÖZET

Hücre Kültürlerinde Oksidatif Stres Sonucu Oluşan DNA Hasarları ve Zeytinyağının Koruyucu Etkisi

Reaktif oksijen türleri (ROT) proteinler, membran lipitleri ve DNA gibi birçok hücresel molekülle reaksiyona girip bu moleküllerin yapısını değiştirerek hasar oluşturabilir. DNA’da meydana gelen oksidatif hasarın mutasyon, kanser oluşumu ve yaşlanma ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmektedir.

Bazı doğal ürünler (zeytinyağı, yeşil çay, ayçiçeği yağı vb.) antioksidan aktiviteye sahiptir. Özellikle zeytinyağı serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip birçok fenolik bileşik içerir. Bununla beraber, zeytinyağının oksidatif DNA hasarları üzerine etkisi, gene özgü olarak bugüne kadar hiç araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, oksidatif stres altındaki HeLa hücrelerinde belirli DNA bölgelerinde [transkripsiyonel olarak aktif olan APEX (Apürinik/apirimidinik endonükleaz) ve inaktif olan β -globin gen kümesi ve mtDNA’nın belli bir bölgesinde] meydana gelen DNA hasarları ve zeytinyağı fenolik fraksiyonunun bu hasarları önleyici etkisi gene özgü “Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu” (“Quantitative Polymerase Chain Reaction”, QPCR) analizi ile belirlendi. Elde edilen veriler, mtDNA’nın nükleer DNA’ya göre oksidatif strese karşı daha hassas olduğunu ve zeytinyağı fenolik fraksiyonu (ZFF)’nin nDNA’daki oksidatif hasarı tamamen önlediğini gösterdi. ZFF’nun hem normal hem de oksidatif stres koşullarında hücre içi ROT miktarını belirgin düzeyde azalttığı saptandı. Apoptoz düzeyi kaspaz 9 enzim aktivitesinin ölçümüyle belirlendi ve ZFF’nun oksidatif stres tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünü engelleyici etkiye sahip olduğu saptandı. Ayrıca mtDNA’da hasara neden olan oksidatif stresin sitokrom oksidaz enzim aktivitesini yaklaşık % 44 oranında azalttığı ve ZFF’nun bu enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Sonuç olarak, zeytinyağının HeLa hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğu ve bu etkisini, hücre içi ROT miktarını düşürerek, nDNA’yı koruyarak ve oksidatif stresin apoptotik etkisini baskılayarak gerçekleştirdiği ortaya konuldu.

SUMMARY

Oxidative Stress-Induced DNA Damage in Cell Culture and Protective Effect of Olive Oil

Reactive oxygen species (ROS) can cause damages on many cellular molecules such as proteins, membrane lipids and DNA by reacting with them and changing the structure. The resulting oxidative damage to DNA, is proposed to be directly related with mutagenesis, carcinogenesis and aging.

Some natural products (olive oil, green tea, sunflower oil etc.) have antioxidant activity. Especially, olive oil contains many phenolic compounds which potentially possess free radical scavenging activity. However, the effect of olive oil on gene specific oxidative DNA damage has not been investigated up to date.

In this study, DNA damages in specific sequences under oxidative stress [transcriptionally active APEX (Apurinic/apyrimidinic endonuclease) gene, transcriptionally inactive β -globin gen cluster and a mtDNA fragment] and protective effect of olive oil phenolic fraction on these damages were determined on HeLa cells with gene specific “Quantitative Polymerase Chain Reaction” (QPCR) analysis. The obtained data showed that mtDNA is more sensitive to oxidative stress than nuclear DNA and phenolic fraction of olive oil completely prevents the oxidative damage on nuclear DNA. Phenolic fraction of olive oil significantly decreased the intracellular ROT level both in normal and oxidative stress conditions. Apoptosis was determined by the measurement of caspase 9 enzyme activity and it was observed that the phenolic fraction of olive oil has prohibitive effect on apoptotic cell death induced by oxidative stress. Furthermore, it was determined that the oxidative stress which causes damages on mtDNA, decreased the cytochrome oxidase enzyme activity by approximately 44 % and observed that phenolic fraction of olive oil has not effect on this enzyme activity.

As a result, it is revealed that olive oil prevents HeLa cells against oxidative stress by decreasing ROT level, protecting nDNA and suppressing the apoptotic effect of oxidative stress.

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROT) canlı hücrelerde normal hücrel metabolizma sırasında veya yüksek sıcaklık, UV ışınları, terapötik ajanlar ve ozmotik stres gibi dışsal kaynakların etkisiyle meydana gelir. ROT gerek hayvansal gerekse bitkisel sistemlerde, hücrelerarası sinyal iletiminde önemli fizyolojik görevler üstlenir. Ayrıca hücre ölümünü ve nekrozu uyarır, birçok genin anlatımını indükler veya baskılar. Ancak proteinler, zar lipitleri ve DNA gibi birçok hücrel molekülde zararlı yapısal değişimlere de yol açabilir. ROT'nin bu olumsuz etkileri oksidatif DNA hasarı, mutagenез, karsinogenез, yaşlanma ve birçok dejeneratif hastalıkla ilişkilidir (Croteau ve Bohr, 1997; Elliott ve diğ., 2000; Mandavalli ve diğ., 2002; Bohr, 2002). Özellikle nükleer DNA'da (nDNA) meydana gelen mutasyonların birikimi çoklu mutasyonların önemli olduğu bir süreç olan kanser gelişimine ve çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bunun yanı sıra, mitokondriyal DNA (mtDNA)'da meydana gelen hasarların da diğer mutasyonlarla birlikte bazı hastalıklarda [örneğin, Leber's Kalıtsal Optik Nöropati ve Eksternal Oftalmoplegya gibi sinir dejenerasyonu ile ilgili hastalıklar] ve iskemi-reperfüzyon hasarında etkili olduğu öne sürülmektedir (Croteau ve Bohr, 1997; Elliott ve diğ., 2000; Cooke ve diğ. 2003). Normal şartlarda veya bazı dışsal faktörlerin etkisi ile artan ROT miktarının DNA'da meydana getireceği hasarın belirlenmesi, gerek bu hasarla ilişkili hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerekse insanların bu hastalıklara olan yatkınlıklarının belirlenmesi açısından önemlidir.

Aerobik canlıları oksidatif hasarlardan koruyan çeşitli sistemler vardır. Bunlar; oksidasyona karşı savunma enzimleri, sürekli veya uyarılabilen antioksidanlar, DNA onarım sistemleri ve hücre çevrimi kontrol sistemleridir. İlk savunma bariyerini enzim sistemleri ve antioksidan maddeler oluşturur. Antioksidanların bir kısmı organizmanın endojen bir parçasıyken, bazıları gıdalar, gıda katkıları ve ilaçlarla dışarıdan alınır.

Birçok doğal ürünün, özellikle gıda olarak tüketilen çeşitli meyve ve sebze (örneğin; portakal, limon, brokoli, domates, siyah ve yeşil çay vb.) ile bitkisel yağların (örneğin, zeytinyağı, ayçiçeği yağı, soya yağı vb.) antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisi olduğu bilinmektedir (Visioli ve diğ., 1998; Collins ve Horvathova, 2001; Visioli ve diğ., 2002a; Visioli ve diğ., 2002b; Quiles ve diğ. 2002b; Hui-Lian ve diğ., 2003; Vayalil ve diğ., 2003). Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarını engelleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Duthie ve diğ., 1997; Abalea ve diğ., 1999; Collins ve Horvathova, 2001; Lima ve diğ., 2006; Garcia-Alonso ve diğ., 2007; Guo ve diğ., 2010). Akdeniz bölgesinde yaşayan insanlarda koroner kalp hastalıkları ve belirli kanser türlerinin (prostat, göğüs ve kolon kanseri) az görülmesi, beslenmede zeytinyağının tercih edilmesiyle ilişkilendirilmiştir (Budiyanto ve diğ., 2000; Visioli ve diğ., 2002a).

Zeytinyağı, yüksek antioksidan aktiviteye sahip birçok fenolik bileşik içermekte olup, çeşitli bileşenlerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkisi farklı hücre sistemlerinde ortaya konulmuştur (Tablo 1.1).

Zeytinyağının oksidatif hasarları önleyici etkisi, bazı hayvan modellerinde de test edilmiştir. Zeytinyağındaki bir bileşen olan skualen ile beslenen sıçanlarda azoksimetan ile indüklenen kolon kanseri gelişimi gerilemiştir (Rao, 1998). Derilerine zeytinyağı sürülen farelerde, UV uygulamasıyla meydana gelen DNA hasarlarında (Ichihashi ve diğ., 2000) ve cilt kanseri gelişiminde azalma ve gecikme kaydedilmiştir (Budiyanto ve diğ., 2000). Zeytinyağı ile beslenen sıçanlarda kemoterapötik bir ajan olan doksorubisinin kemik iliğinde oluşturduğu kromozom aberasyonları kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (Antunes ve Takahashi, 1999). Buna karşın sıçan karaciğerinde belli tipteki DNA hasarlarını azaltıcı bir etki göstermemektedir (Eder ve diğ., 2006).

İnsanlar üzerinde gerçekleştirilen birçok çalışmada zeytinyağının oksidatif stresin olumsuz etkilerini (örneğin, hücre içi ROT düzeyini düşürerek ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek) azalttığı ortaya konulmuştur (Marrugat ve diğ., 2004; Weinbrenner ve diğ., 2004; Covas ve diğ., 2006a; Salvini ve diğ., 2006; Gimeno ve

diğ., 2007; Machowertz ve diğ., 2007; Di Benedetto ve diğ., 2007). Doğrudan üriner sistemdeki oksidatif hasarlı DNA atıklarının (etheno-DNA) incelendiği bir çalışmada, fenolikçe zengin zeytinyağı tüketiminin özellikle 8-oxodG ve malondialdehit (MDA) miktarını azalttığı belirlenmiştir (Weinbrenner ve diğ., 2004; Machowertz ve diğ., 2007). Avrupa'daki 6 araştırma merkezi tarafından 200 kişi üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 3 haftalık zeytinyağı tüketiminin HDL kolesterol düzeyini artırdığı ve okside LDL miktarını azalttığı ortaya konulmuştur (Covas ve diğ., 2006a). Ancak literatürde tam tersi bulgulara da rastlanmaktadır. Üç hafta boyunca fenolik içeriği yüksek zeytinyağı ile beslenen bireylerin plazmalarında protein karbonil, lipid hidroperoksit, MDA ve antioksidan kapasite değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Visser ve diğ., 2001). Benzer şekilde, sağlıklı bireylerde 3 haftalık zeytinyağı tüketiminin, etheno-DNA düzeyinde önemli bir değişime yol açmadığı öne sürülmektedir (Hillestorm ve diğ., 2006).

Tablo 1.1: Farklı hücre tiplerinde çeşitli zeytinyağı bileşenlerinin oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri.

Zeytinyağı Bileşeni	Hücre Tipi	Stres ajanı	Oksidatif stres parametresi (etki)	Kaynaklar
Hidroksitirosol	Caco-2 (Kolon kanseri)	H ₂ O ₂	MDA (↓)	Manna ve diğ., 1997
Hidroksitirosol	N-18-RE-105 (Retinal/Nöroblastomal hibridoma)	ONOO ⁻	DNA hasarı (↓)	Diena ve diğ., 1999
Hidroksitirosol, tirosol, kafeik asit,	PC3 (Prostat kanseri)	H ₂ O ₂	DNA hasarı (↓), GPx (↓)	Quiles ve diğ., 2002a
Fenolik özüt, hidroksitirosol, kafeik asit	Jurkat (T lenfosit)	H ₂ O ₂	DNA hasarı (↓)	Nousis ve diğ., 2005
Hidroksitirosol	M14 (melanoma)	UV-A	ROT (↓), TBARS(↓), Protein hasarı (↓)	D'Angelo ve diğ., 2005
Hidroksitirosol	HepG2 (Hepatokarsinoma)	t-BOOH	ROT (↓), MDA (↓), GPx (↓), GSH (↑)	Goya ve diğ., 2007
Hidroksitirosol, tirosol,oleuropein, kafeik asit, fenolik özüt	HL60 (promiyelositik lösemi) ve PBMC (periferel kan)	H ₂ O ₂	DNA hasarı (↓)	Fabiani ve diğ., 2008
Hidroksitirosol	TPH-1 (monosit)	LPS	ROT (↓),NO (↓), GSH (↑)	Zhang ve diğ., 2009
Hidroksitirosol	HaCaT ((keratinosit)	UV-B	DNA hasarı (↓), ROT (↓)	Guo ve diğ., 2010

Genomun farklı bölgelerinde kimyasalların ve radyasyonun yol açtığı çeşitli tipte oksidatif hasarların oluşum ve onarım mekanizmaları oldukça değişkendir (Wang ve diğ., 2003). Ökaryotlarda oksidatif stresin en yoğun olduğu organel ise mitokondridir. Bu nedenle mtDNA, nDNA'ya göre genotoksik ajanlara 2-3 kat daha duyarlıdır (Wei ve Lee, 1998; Sawyer ve Van Houten, 1999).

Yapılan literatür incelemelerinde, zeytinyağının oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkisini gene özgü olarak inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* oksidatif stres uygulanacak HeLa hücre hattındaki belirli DNA bölgelerinde meydana gelen oksidatif hasarları gene özgü Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Quantitative Polymerase Chain Reaction", QPCR) yöntemi ile belirlemek ve zeytinyağının bu hasarları önlemedeki rolünü inceleyerek, zeytinyağının antioksidan etkisini moleküler boyutta irdelemektir.

Çalışmanın amaçları doğrultusunda, öncelikle HeLa hücre kültürü sistemi kurulmuştur. Oksidatif stres ajanı olarak seçilen H_2O_2 'in, koruyucu etkisi test edilecek zeytinyağı fenolik fraksiyonu (ZFF)'nun ve standart bileşen gallik asit (GA)'in sitotoksik etkisi belirlenerek sonuçlara göre deney grubuna uygulanacak dozlara karar verilmiştir.

Hidrojen peroksitin hücre içine alınımı test etmek amacıyla, stres ve ön uygulama koşullarında besiyerinde kalan H_2O_2 miktarı belirlenmiştir. Besiyerindeki H_2O_2 derişiminde gözlenen azalmanın, hücre içindeki tüketiminden kaynaklandığı; dolayısıyla uygulanan H_2O_2 'in hücre içine alındığı ve böylece hücreler üzerinde istenen oksidatif stresin oluşturulduğu belirlenmiştir.

Oksidatif stresin en belirgin etkisi hücre içi ROT düzeyini yükseltmesidir. Bu nedenle ZFF veya GA uygulamaları ile oksidatif stres ajanı H_2O_2 uygulamasının hücre içi ROT düzeyini nasıl etkilediği, hücre içi ROT miktarının fluorometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Oksidatif hasarın belirleneceği hedef DNA bölgeleri:

- 1) Oksidatif DNA hasarının onarımında merkezi bir rol oynayan ve oksidatif stres ajanlarının subletal dozları ile aktive olan apürinik/ apirimidinik endonükleaz (APEX) enzimine ait gen bölgesi,
- 2) Transkripsiyonel olarak inaktif β -globin gen kümesine ait bir DNA bölgesi,
- 3) Mitokondriyal DNA'da sitokrom c oksidaz enziminin iki katalitik altbirimi (COX I ve COX II) ile tRNA-serin ve tRNA-asparajin gen bölgelerini içeren bir bölge olarak belirlenmiştir.

DNA hasarını belirlemek için ilk olarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve herhangi bir uygulama yapılmayan hücrelerden izole edilen DNA örnekleri ile QPCR analizinde ilk defa kullanılacak olan her üç hedef dizi ile nDNA ve mtDNA internal kontrolleri için PCR optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonun ardından izole edilen DNA'lar kullanılarak QPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Farklı transkripsiyonel aktiviteye sahip nDNA bölgelerinin seçilmesi, transkripsiyonel aktivite ile hasar oluşumu arasındaki ilişkiyi belirlememize olanak sağlamıştır. Ayrıca, seçilen gen bölgeleri, nDNA ile mtDNA'nın strese duyarlılıkları arasındaki farkın ortaya çıkarılmasına da katkıda bulunmuştur.

Ayrıca, oksidatif DNA hasarı ile ilişkili olduğu bilinen mitokondriyal fonksiyon kaybının bir beliteci olarak, mitokondrideki elektron taşıma zincirinde son elektron alıcısı olarak görev yapan ve kompleks IV olarak adlandırılan sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. ZFF veya GA uygulamalarının sitokrom oksidaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir.

HeLa hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak amacıyla uygulanan H_2O_2 'in apoptozu hücre içi yolak aracılığıyla tetiklediği bilinmektedir (Singh ve diğ. 2007). Bu nedenle hücrelere uygulanan H_2O_2 'in apoptozu indükleyip indüklediği ve ZFF veya GA uygulamalarının bu süreçte etkili olup olmadığı, apoptotik iç yolakta başlatıcı kaspaz olarak görev yapan kaspaz 9'un aktivitesi aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Zeytinyağı fenolik fraksiyonunun (ZFF) ve standart olarak gallik asitin (GA) oksidatif DNA hasarlarını önleyici etkisi, gene özgü olarak QPCR tekniği ile ilk kez bu çalışmada ortaya konulmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron çiftine sahip ve bağımsız olarak varlığını sürdürebilen kimyasal unsurlar **serbest radikal** olarak tanımlanır. Oksijen atomu içeren çeşitli serbest radikaller ile oksijen metabolizması sırasında oluşan ve radikal olmayan hücrel ara ürünlere genel olarak reaktif oksijen türleri (**ROT**) denir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Hücre içi temel reaktif oksijen türleri (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Peroksil radikali (RO_2^{\cdot})	Ozon, (O_3)
Alkoksil radikali (RO^{\cdot})	Singlet oksijen (O_2)
Hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, aerobik metabolizmanın normal birer yan ürünü olarak veya radyasyon, ksenobiyotikler ve ağır metaller gibi dış faktörlerin etkisiyle üretilirler (Cadenas, 1989). ROT, biyolojik sistemlerde hücre içi sinyalleşmede önemli bir rol oynadığı gibi (Hoidal, 2001), mitozu aktive edici protein kinazları da içeren hücre sinyalleşme kaskadlarını aktive eder, apoptoz ve nekrozu uyarır, birçok genin anlatımını baskılar veya uyarır ve hücre morfolojisinde ve canlılığında değişimlere yol açar (Wei ve Lee, 1998; Mandavilli ve diğ., 2002). Hücre içinde ROT ve reaktif azot türleri (RAT) derişimlerinin, DNA, proteinler ve lipitleri içeren biyomoleküller için toksik düzeye gelmesi sonucunda oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres, “ROT/RAT düzeyinin proteinler, zar lipitleri veya DNA’da oksidatif hasar oluşturacak şekilde artması” olarak da tanımlanmaktadır. Sağlıklı bir hücrede, fazla ROT ve RAT, koruyucu antioksidan mekanizmalar (katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler) ve glutatyon, tiyoredoksin gibi

moleküler süpürücüler tarafından etkisiz hale getirilir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Oksidatif stresin kanser (göğüs, kolorektal, gastrik vb), yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar [Parkinson, Alzheimer, Friedrich ataksia, Huntington, amiyotropik lateral sklerozis (ALS)], kardiovasküler hastalıklar (aterosklerozis vb), karaciğer hastalıkları (alkolik hepatit, hemokromatozis vb), asbestozis ve mutageniz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Halliwell, 1997; Klaunig ve Kamendulis, 2004, van Houten ve diğ., 2006).

2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

ROT aerobik hücrelerde normal hücre metabolizma sırasında mitokondrideki elektron taşıma zinciri (ETZ) üzerinde oluşabileceği gibi farklı süreçlerden de kaynaklanabilir (Klaunig ve Kamendulis, 2004).

İyonize radyasyonun (özellikle UV, X ve γ ışınları) DNA ve diğer makromoleküller tarafından absorbe edilmesi sonucu bu moleküllerde doğrudan hasar oluşturabileceği gibi; dolaylı olarak da, %70'i su olan hücrelerde UV enerjisinin yaklaşık %80'inin tutulmasına ve bu sırada meydana gelen elektron kaçakları ile ROT oluşumuna ve oksidatif strese neden olabileceği belirlenmiştir (Renzing ve diğ., 1996; Wei ve diğ., 1996; Svobodova ve diğ., 2003).

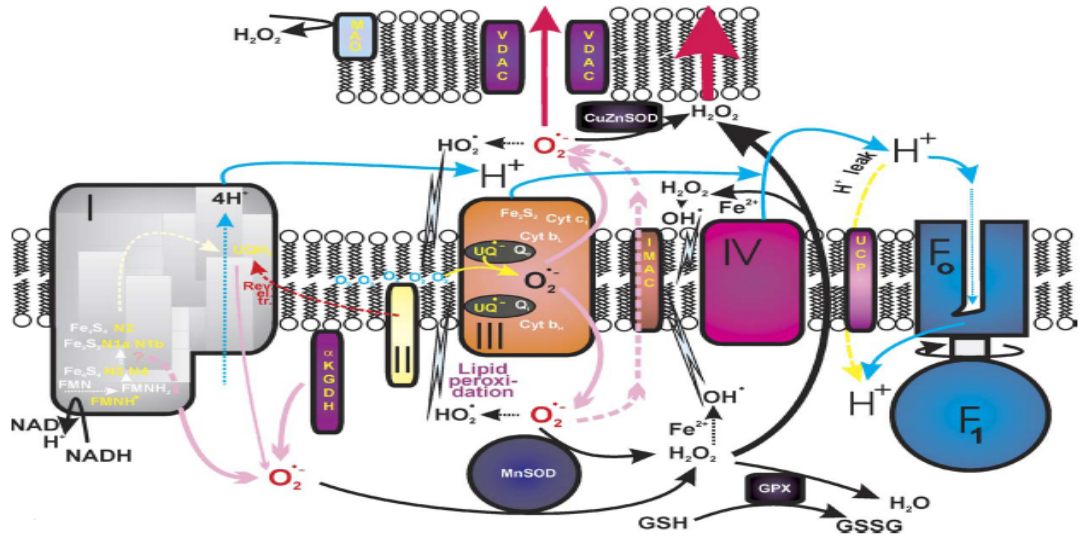
Diğer dışsal etkenler ise vücuttaki antioksidanların tüketilmesine ve dolaylı olarak ROT/RAT oluşumuna sebep olarak ROT/RAT dengesinin bozulmasına ve/veya doğrudan oksidatif hasar oluşumuna neden olabilirler (Caporaso, 2003). Çeşitli patolojik süreçler (örneğin, ALS) sonucunda ROT üretimi artarak makromoleküllerde hasara sebep olur (Cooke ve diğ. 2003). İnflamasyon bölgesindeki aktif nötrofil, eozinofil ve makrofajlar da fagositik aktiviteleri sonucu önemli miktarda ROT ortaya çıkmasına neden olur (Klaunig ve Kamendulis, 2004).

Peroksizomal metabolizmanın artışı ile peroksidaz ve oksidaz gibi enzimlerin aktiviteleri de ROT oluşumuna yol açar; fakat bu sırada meydana gelen ROT miktarı ETZ'nde meydana gelen ROT miktarı yanında çok azdır (Bohr ve diğ., 2002, Klaunig ve Kamendulis, 2004).

2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası ve Özellikleri

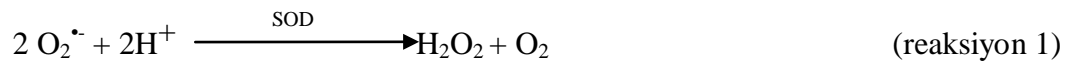
2.1.2.1. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$)

Okülatif stres sonucu en çok oluşan ROT, $O_2^{\cdot-}$ 'dir. $O_2^{\cdot-}$ moleküler oksijenin tek elektron indirgenmesinden oluşur. Mitokondride, ETZ'den özellikle kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve III'ten (ubisemikinon) sürekli elektron kaçıışı olmakta ve bu elektronlar doğrudan moleküler oksijene geçerek $O_2^{\cdot-}$ oluşturmaktadır. Bu nedenle ROT için en önemli hücresel kaynak mitokondridir (Jezek ve Hlavat, 2005, van Houten ve diğ., 2006) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: ETZ'nde elektron ve protonların hareketi ile $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşumu (pembe oklar mitokondri matriksine ve zarlararası alana $O_2^{\cdot-}$ kaçışını, kırmızı oklar sitoplazmaya giden yolu, mavi ve sarı oklar ise protonların izlediği yolları göstermektedir).

Normal hücrelerde toplam oksijenin yaklaşık %1-5'i $O_2^{\cdot-}$ 'ye dönüşür (Turrens, 1997). $O_2^{\cdot-}$ oluşumunda diğer içsel kaynaklar, peroksisomal bir enzim olan ksantin oksidaz (Kooij, 1994) ve makrofaj zarına bağlı NADPH oksidazdır (Babior, 2000). Sigara dumanı ve iyonize radyasyon ise $O_2^{\cdot-}$ oluşumuna yol açan en önemli dışsal kaynaklardır (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Süperoksit anyonu tek başına reaktif bir ara ürün olarak kabul edilmez (Halliwell, 1996), çünkü zarlardan hızlı bir şekilde geçemez ve fizyolojik pH'da kendiliğinden dismutasyona uğrar (reaksiyon 1).

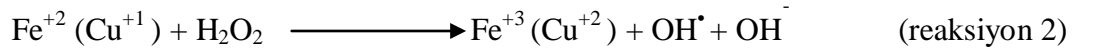


Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hızlandırılan bu nötralizasyon reaksiyonu sonucunda H_2O_2 ve ardışık olarak da OH^\bullet gibi daha kuvvetli reaktif oksijen türleri açığa çıkar (reaksiyon 2) (Fridovich, 1995).

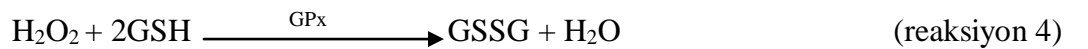
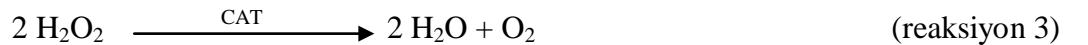
2.1.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit aerobik organizmalarda en fazla bulunan ROT'nden biridir ve hem potansiyel bir toksik ajandır hem de sinyalleşmede merkezi rol oynayan bir bileşendir (Bienert ve diğ., 2006). Mitokondride aerobik metabolizma sonucu devamlı olarak meydana gelen bu madde *in vivo*'da diğer türlere göre daha karardır. NAD(P)H/NAD(P)⁺, glutatyon/oksitlenmiş glutatyon ve protein-SH/protein-SS-R gibi redoks sistemlerini doğrudan etkilemesiyle hücre gelişimini, bölünmesini, ölümünü ve sinyal iletimini düzenlediği düşünülmektedir (Bienert ve diğ., 2006).

Hücre içindeki H_2O_2 derişimi, hücre içindeki oluşum ve süpürülme (scavenging) miktarı ile hücre içine giriş/çıkışı arasındaki orana bağlıdır. Hücre zarlarından geçişi difüzyon yoluyla veya bazı akuaporinler ile sağlanmakla (Bienert ve diğ., 2006) beraber, hücrenin gelişim safhasına bağlı olarak zarın yapısında meydana gelen değişimler sonucunda zarın H_2O_2 'e karşı geçirgenliği değişebilmektedir (Antunes ve Cadenas, 2000). O_2^\bullet üreten herhangi bir sistem aynı zamanda H_2O_2 de üretmiş olur. H_2O_2 genellikle, zayıf bir ROT olarak görülür, ancak **Fenton reaksiyonu** adı verilen Fe^{+2} veya Cu^{+1} gibi kısmen indirgenmiş metaller ile girdiği reaksiyon (reaksiyon 2) sonucunda oluşan hidroksil radikali (OH^\bullet) en reaktif türdür ve H_2O_2 'nin toksisitesinden sorumludur (Wardman ve Candeias, 1996).

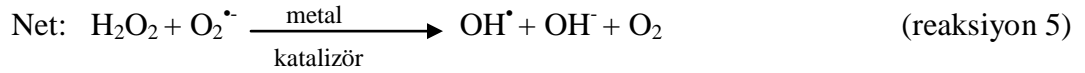
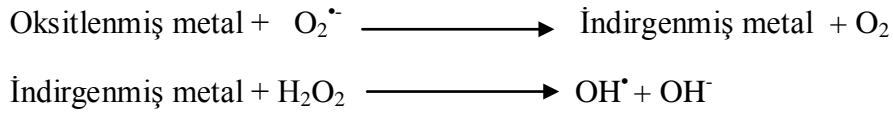


H_2O_2 katalaz (CAT) (reaksiyon 3) veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından (reaksiyon 4) katalizlenen reaksiyonlarla suya indirgenir.



2.1.2.3. Hidroksil Radikali (OH^\bullet)

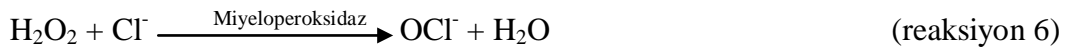
DNA ve diğ er biyomoleküllere doğ rudan hasar veren en reaktif serbest radikal OH^\bullet 'dir (Dizdaroğ lu ve diğ ., 2002; Halliwell ve Gutteridge, 2003). Ayrıca mitokondriyal bir enzim olan piruvat dehidrogenazı da inaktive eder (Tabatabaie ve diğ ., 1996). OH^\bullet , temelde Fenton reaksiyonu (Halliwell ve Gutteridge, 2003) (bkz. reaksiyon 2) ile H_2O_2 'den veya metal (örneğ in demir) katalizli Haber-Weiss reaksiyonu (reaksiyon 5) ile $O_2^{\bullet -}$ 'den oluş maktadır (Kehrer, 2000).



Bugünkü bilgiler ış ığında OH^\bullet 'nin detoksifikasyonundan sorumlu bir enzim bulunmamaktadır. OH^\bullet tarafından indüklenen doku hasarı, geçiş grubu metal iyonlarının, albumin, seruloplazmin, ferritin, transferrin ve metalotiyonein gibi proteinler tarafından bağ lanması ile önlenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

2.1.2.4. Hipoklorik Asit ($HOCl$)

Bir hemoprotein olan miyeloperoksidaz, fagositlerde en çok bulunan proteinlerden biridir. Miyeloperoksidazın nötrofil proteinlerinin %5'ini ve monosit proteinlerinin %1'ini temsil ettiğ i ve insan makrofajlarında da bulunabileceğ i ö ne sürölmektedir (Tsuruta ve diğ .,1999). Nötrofiller aktive olduğ unda, miyeloperoksidaz hücre dış na salınır (King ve diğ ., 1997) ve H_2O_2 'i potansiyel bir oksitleyici olan hipoklorik aside ($HOCl$) dönüş türür (reaksiyon 6).



Hücre içinde çok sayıda biyokimyasal hedefi bulunan $HOCl$ 'in $O_2^{\bullet -}$ veya H_2O_2 'den yaklaşık olarak 100-1000 kat daha toksik olduğu tahmin edilmektedir (Schraufstatter ve diğ ., 1990). Örneğ in, önemli enzimlerin aktivitesini kaybetmesine yol açabilir (Schraufstatter ve diğ ., 1990), plazma zarındaki tiyol gruplarını (SH) oksitleyebilir (Carr ve Winterbourn, 1997), belirli proteinlerin fonksiyonlarını etkileyebilir ve bazı hücre dış ı matris yapı taş larının bağ lanma özelliklerini azaltabilir (Zavodnik ve diğ ., 2001).

HOCl'i nötralize eden bir enzim bilinmemektedir, ancak bu molekül albumin ve askorbik asit ile reaksiyona girerek hücreden uzaklaştırılabilmektedir (Yan ve diğ., 1996).

2.2. OKSİDATİF HASARA UĞRAYAN HÜCRESEL YAPITAŞLARI

2.2.1. Zar Lipitleri

HücreSEL detoksifikasyon sistemlerinin, OH[•] ve özellikle H₂O₂ öncüllerini ortadan kaldırmada yetersiz kaldığı durumlarda, ROT lipid peroksidasyonunu uyararak, hücrenin fosfolipid zarlarının temel bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitlerine ("poly unsaturated fatty acids", PUFA) zarar verir (Gros ve diğ. 2003). Bu yağ asitleri, OH[•] radikali tarafından etkin bir şekilde hasara uğratılır. Lipid peroksidasyonundan türevlenen aldehit, hidroksialkenal ve hidroperoksitler ise yüksek oranda mutajenik ve genotoksik özelliğe sahip DNA modifikasyonlarının oluşumuna sebep olur. HücreSEL zarlarda hidroperoksitlerin artışı, zarın akışkanlığını, transmembran (zar geçişli) enzimlerin aktivitesini, taşıyıcıların, reseptörlerin ve diğer zar proteinlerinin işlevini belirgin şekilde etkiler (Wagner ve diğ., 1994). Sonuçta hücre zarının iletkenliği ve seçiciliği değişir, hücre hacmi homeostazisinde ve hücreSEL metabolizmada aksamalar meydana gelir (Chen, 1995). Ayrıca, hidroperoksitler ve aldehitler, hücre ve organeller üzerinde doğrudan toksik etki gösterebilir (Aw, 1998).

2.2.2. Proteinler

Protein oksidasyonunun yaşlanma, oksidatif stres ve birçok hastalık ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (Linton, 2001). Protein oksidasyonu, bir proteinin doğrudan reaktif oksijen türleri tarafından veya dolaylı olarak oksidatif stresin ikincil yan ürünleri tarafından kovalent modifikasyona uğratılması olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerin molekül-içi veya moleküller-arası (özellikle disülfid bağlarının oluşumuna sebep olan) oksidasyonu, yapısal değişikliklere ve bunun sonucunda da işlevsel değişim ve kayıplara yol açar (Biernert ve diğ.,2006). Bu yapısal değişiklikler arasında, bağlanma ve enzim aktivitelerinin inhibisyonu, agregasyon ve proteolize karşı aşırı duyarlılık, hücre içine çeşitli maddelerin artan ya da azalan alımları ve hücre immünogenetiğinin değişmesi gibi çeşitli işlevsel değişiklikler sayılabilir (Shacter, 2000).

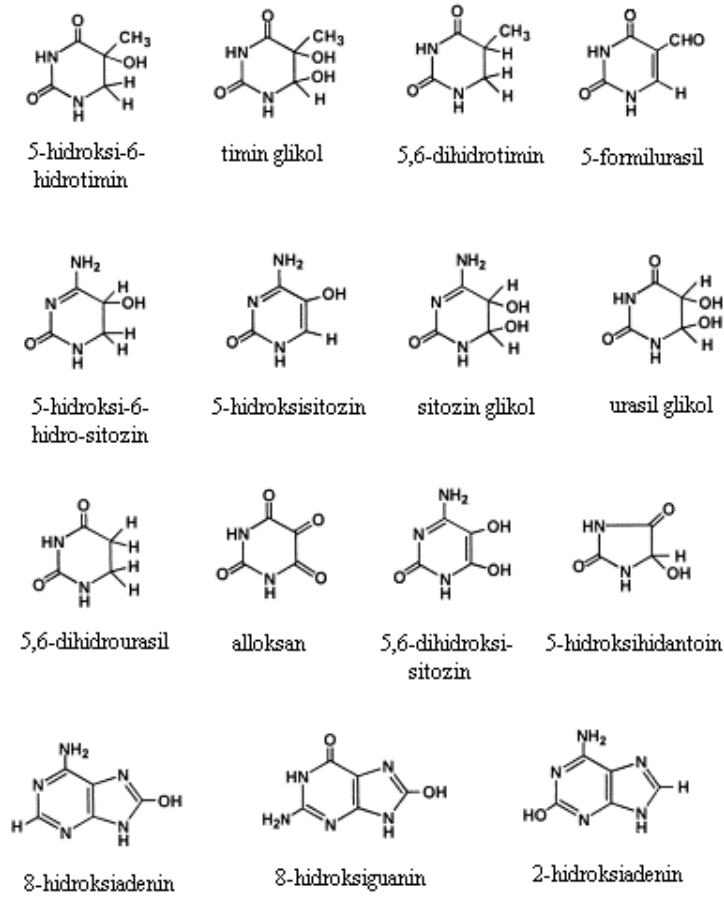
ROT;

- amino asitlerin yan zincirlerinde oksidasyona,
- protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna,
- protein omurgasının oksidasyonu sonucunda protein fragmentasyonuna neden olmaktadır (Stadtman, 2006).

ROT tarafından meydana getirilen protein modifikasyonlarının rastgele bir şekilde değil özgül proteinler üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Cumming ve diğ. (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada H₂O₂ uygulaması sonucunda doza bağlı olarak bazı proteinlerin disülfid bağları inhibe edilmiş veya uyarılmıştır. Bu proteinlerin çoğunlukla translasyon ve enerji üretimi ile ilgili proteinler olduğu görülmüştür.

2.2.3. DNA

DNA'da ROT tarafından meydana getirilen hasara **oksidatif DNA hasarı** denir. Hem nükleer hem de mitokondriyal DNA, çeşitli DNA modifikasyonları ile sonuçlanan ROT saldırılarına hedef olmaktadır (Henle ve Linn, 1997). mtDNA ROT'ların meydana getirdiği hasarlara karşı nDNA'dan 2-3 kat daha duyarlıdır (Wei ve Lee, 1998; Sawyer ve van Houten, 1999). DNA'nın üç temel bileşeninde de hasar oluşabilir. Fakat bazlar, şeker ve fosfat grubuna göre bazı kimyasallar için daha iyi birer hedeftirler. Oksidatif stres sonucunda meydana gelen birçok farklı baz hasarı belirlenmiştir (Bohr, 2002). Normal metabolizma sonucu oluşan reaktif türler de DNA'da düşük oranda hasara neden olur. Dizdaroğlu (1993) tarafından yapılan bir çalışmada 100 farklı oksidatif baz modifikasyonu belirlenmiştir (Şekil 2.2). Fakat bunlardan en çok bilineni 8-hidroksiguanozin (8-oxoG)'dir. En çok karşılaşılan modifikasyonlar, adenozin trifosfat eksikliğine ve gen mutasyonlarına neden olan baz hidroksilasyonları ve zincir kırıklarıdır. OH•nin DNA bazlarının çift bağlarına eklenmesi, timin veya şeker grubunun beş karbonundan herhangi birinden hidrojen atomu alması sonucunda oluşan baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları sonucunda birçok modifikasyon içeren, bazsız bölgeler, zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlarını kapsayan çeşitli hasarlar oluşur.



Şekil 2.2: DNA’da en çok görülen oksidatif baz hasarları (Dizdaroğlu ve diğ., 2002).

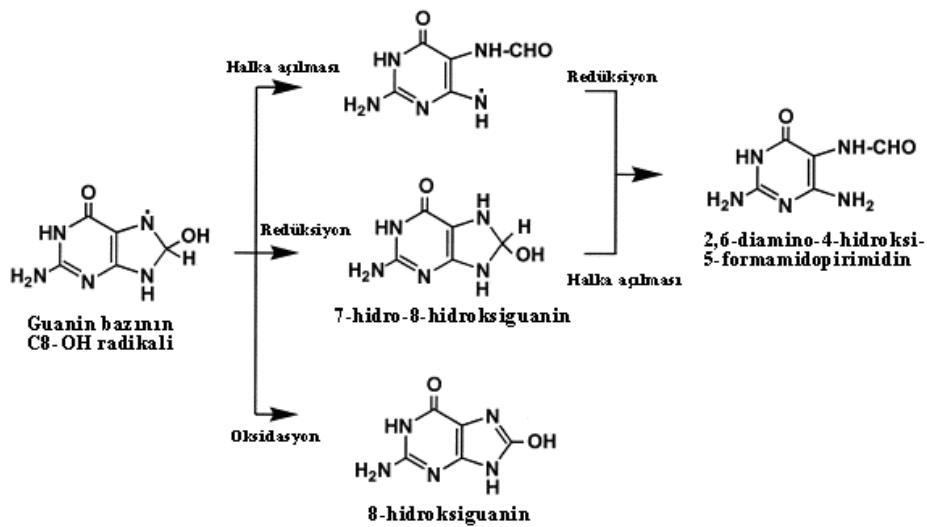
DNA modifikasyonlarının önemli bir kısmını, serbest radikallerin en reaktifi olarak tanınan OH^\bullet tarafından meydana getirilir (Takeuchi, diğ., 1996). OH^\bullet 'nin DNA ile en çok gerçekleştirdiği reaksiyonlar 4 grup altında toplanabilir:

1. Pirimidin bazlarının C5 ve C6 pozisyonuna eklenerek baz radikalleri oluşturur ve bu radikallerin ardışık oksidasyon ve/veya deprotonasyon reaksiyonları sonucunda timin glikol ve sitozin glikole dönüşmesine neden olur. Bu ürünlerden de dehidratasyon veya deaminasyonla farklı ürünler oluşabilmektedir. Bu ürünler ve etkileri Tablo 2.2’de özetlenmiştir.
2. Pürin bazlarının C4, C5 ve C8 pozisyonuna eklenerek baz radikalleri oluşturur. Bu baz radikalinin tekrar oksidasyon veya redüksiyon reaksiyonu geçirmesi sonucunda farklı ürünler oluşabilmektedir. Bu tip reaksiyonların bir örneği Şekil 2.3’de verilmiştir.

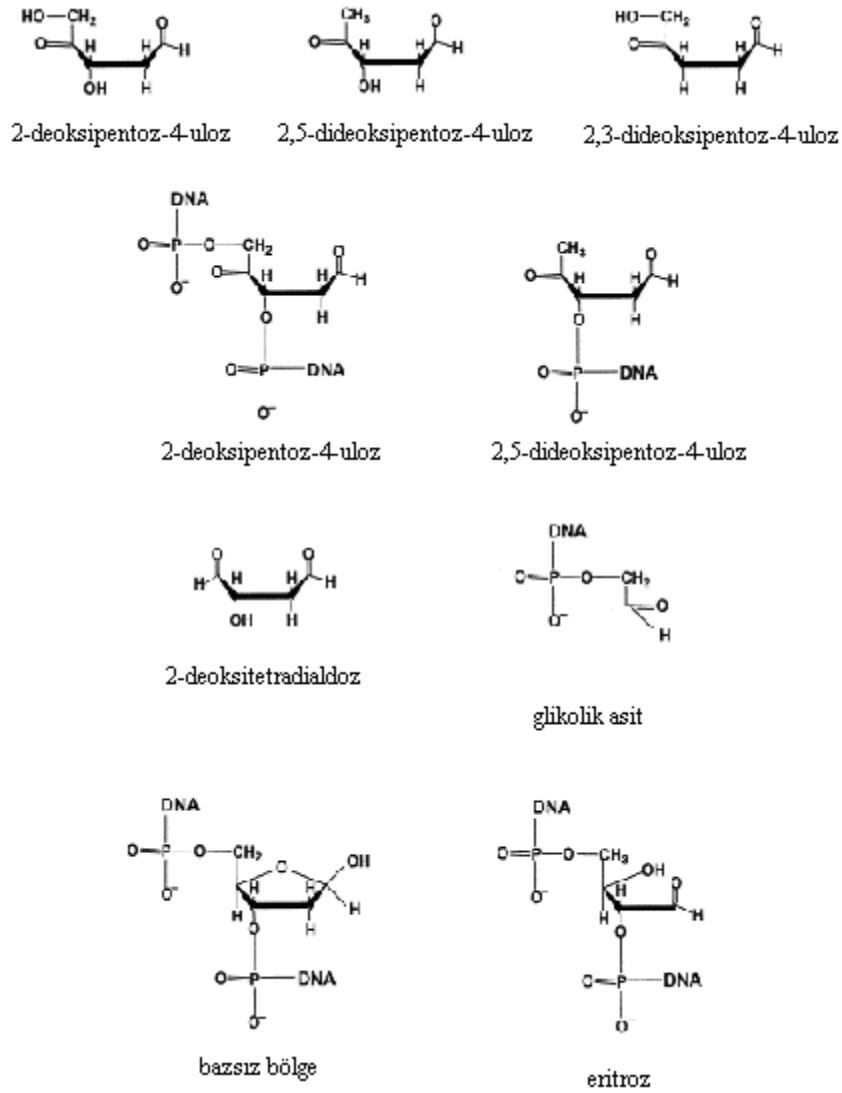
3. Şeker grubunun herhangi bir karbon atomundan H atomu alması ile karbon merkezli şeker radikalleri ve bunların girdiği çeşitli reaksiyonlar sonucunda çeşitli tipte modifiye şeker ürünleri oluşur (Şekil 2.4). Bu ürünler ya DNA'dan ayrılır ya da bir veya her iki fosfat grubu ile bağlı kalabilir. Böylece zincir kırıklarına en çok yol açan DNA hasarı meydana gelmiş olur.
4. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda DNA-protein çapraz bağları da oluşabilir. DNA ile ilişkide olan bir proteinin tirozin halkasına timinin allil radikalının eklenmesi ve ardından gerçekleşen oksidasyon reaksiyonu, DNA-protein çapraz bağının oluşumuna yol açmaktadır (Dizdaroğlu ve diğ., 2002).

Tablo 2.2: ROT tarafından oluşturulan tipik pirimidin hasarları ve biyolojik sonuçları (Wallace, 2002).

Hasar	DNA polimerazı bloke etme	Letalite	Mutajenite
Timin glikol	Evet	Evet	Zayıf
Dihidrotimin	Hayır	Hayır	Yok
5-Hidroksimetilurasil	Hayır	Hayır	Zayıf
5-Formilurasil	Hayır	Hayır	T→C, T→A
β-Ureidoizobütirik asit	Evet	Evet	T→A
Hidantoin	Evet	-	-
Urasil glikol	Hayır	Hayır	C→T
5-Hidroksisitozin	Hayır	Hayır	C→T, C→G
5-Hidroksiurasil	Hayır	Hayır	C→T
Dihidrourasil	Hayır	-	-



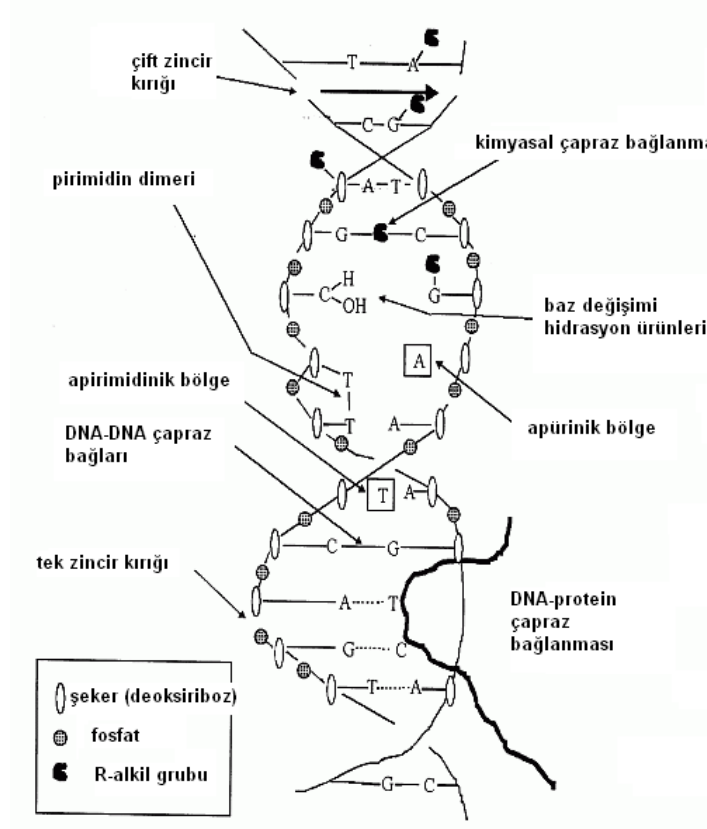
Şekil 2.3: OH radikalının oluşturduğu bazı ürünler (Dizdaroğlu ve diğ., 2002).



Şekil 2.4: DNA'da en çok görülen oksidatif şeker hasarları (Dizdaroğlu ve diğ., 2002).

Tüm bu ürünlerin oluşumu sonucunda bazsız bölgeler ve zincir kırıkları başta olmak üzere DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu engelleyen birçok DNA hasarı meydana gelmektedir (Şekil 2.5).

H₂O₂ ise sitozoldeki nötralize edici enzimlerin etkisiyle yok edilemezse, nukleusa ulaşır, kromatine bağlı demir (veya oksidatif hasara uğramış Cu/Zn-SOD'tan açığa çıkan bakır) ile reaksiyona girerek, yakınındaki DNA molekülüne saldıracak olan OH[•] oluşturur (Park ve Floyd, 1997). OH[•] tarafından meydana getirilen DNA hasarına karşı en önemli koruyucu etkiyi, tiyol bakımından zengin bir protein olan metallothionein sağlamaktadır.



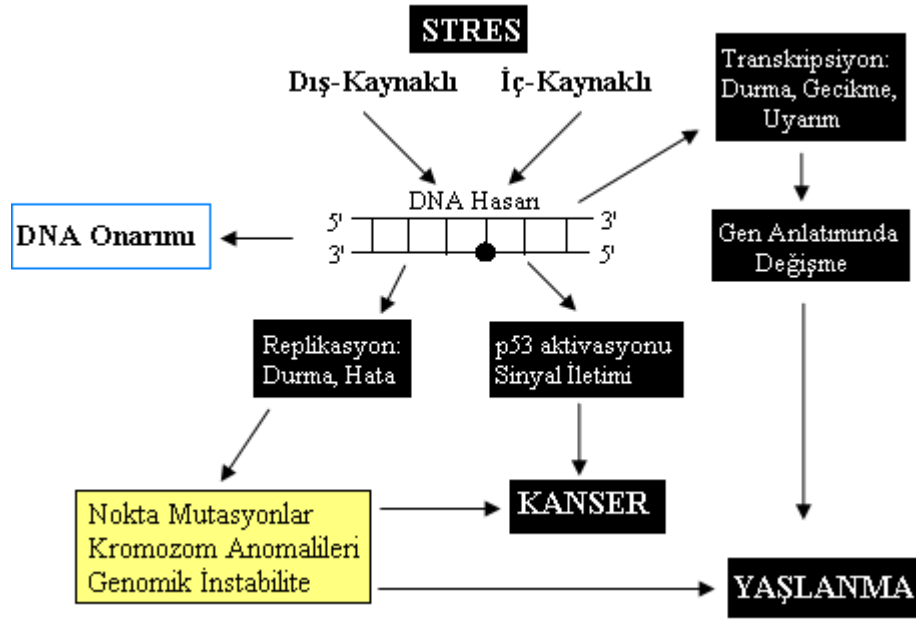
Şekil 2.5: DNA'da meydana gelen oksidatif hasarların toplu gösterimi.

2.2.3.1. Oksidatif DNA Hasarının Biyolojik Sonuçları

Çeşitli koşullar altında veya yaşlanma ile birlikte hücrel antioksidan savunma sistemleri hücreyi oksidatif stresten korumak için yeterli olmaz ve ROT'nin biyomoleküllere verdiği zarar artar. Hasarlar önlenemez veya onarılamazsa çeşitli metabolik aksamalara, mutasyonlara ve kanser gelişimine neden olur (Loeb ve Loeb, 2000; Bohr, 2002; Mandavilli ve diğ., 2002) (Şekil 2.6). Oksidatif DNA hasarının azalması anti-kanser etkisi yaparken artışı ise kanser gelişimini uyarır (Halliwell, 2002). Bu bakımdan DNA hasarının kanser gelişimi ve ROT ile ilişkili hastalıklar için iyi bir belirteç olabileceği öne sürülmektedir (Yakes ve van Houten, 1997; Halliwell, 2002).

Birçok deneysel ve epidemiyolojik çalışma oksidatif DNA hasarının genellikle onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde oluşmasının mutasyonları indüklediğini, yani mutajenik ve karsinojenik özelliğe sahip olduğunu (Salles ve diğ., 1999; Loeb ve Loeb,

2000; Marnett, 2000; Dizdaroğlu ve diğ., 2002; de Souza-Pinto ve diğ., 2008), ayrıca yaşlanma ve dejeneratif hastalıklarla da ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Croteau ve Bohr, 1997; Elliott ve diğ., 2000; Mandavilli ve diğ., 2002; Bohr, 2002). Kanser görülme sıklığının 8-oxoG ve diğer oksidatif hasarların yüksek düzeylerde görülmesi, antioksidan ve onarım enzimlerinin aktivitelerinin değişmesi, antioksidan savunmanın inhibe edilmesi (SOD eksikliği gibi) ve ROT düzeyi ile doğru orantılı bir şekilde arttığını ortaya koyan birçok *in vivo* çalışma mevcuttur (Elchuri ve diğ., 2005; Cooke ve diğ., 2006; Maynard ve diğ., 2009).

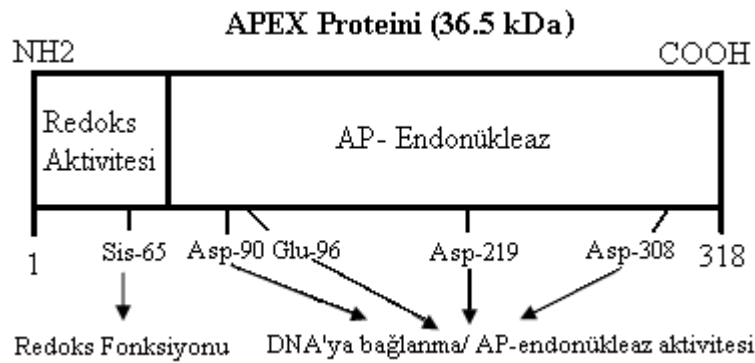


Şekil 2.6. DNA hasarının sonuçları (Bohr, 2002)

2.2.3.2. APEX Gen Bölgesi ve Önemi

İnsan apürinik/apirimidinik endonükleaz, 14. kromozomda yer alan yüksek oranda korunmuş 5 ekzon ve 4 introndan oluşan 2.7 kb uzunluktaki APEX (APE/Ref-1, APE1, HAP1, REF-1) genine ait 318 amino asitlik ve 36,5 kDa'lık, birçok fonksiyonundan biri de DNA onarımı olan bir proteindir (Fritz, 2000) (Şekil 2.7). İki domene sahiptir; N-terminal domeni redoks aktivitesinden, C-terminal domeni ise endonükleaz aktivitesinden sorumludur. APEX geninde, proteinin katalitik aktivitesini değiştiren 4 mutasyon ve protein-DNA interaksiyonlarını etkileyen 4 mutasyon olmak üzere 8 mutasyon bilinmektedir (Evans ve diğ., 2000). Ayrıca proteinin transkripsiyon sonrası fosforilasyon ve redoks modifikasyonları ile modifiye edildiği bilinmektedir (Fritz, 2000). Mitokondri ve nükleusta bulunuşu, onarım aktivitesi ile ilişkiliyen,

sitoplazmada bulunuşu yeni sentezlenmiş transkripsiyon faktörlerinin redoks durumunu değiştiren düzenleyici aktivitesi ile ilgilidir (Frossi ve diğ., 2002). Hücrede birçok çevresel uyarana karşı adaptasyon sağlanmasında sinyal molekülü olarak rol oynar (Fritz, 2000). Hücre döngüsünün kontrolü, farklılaşma, gelişim, nöral uyarım ve apoptoz ile Fos, Jun, p53 gibi kanser oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili birçok transkripsiyon faktörü üzerinde redüksiyon-oksidasyon faktörü olarak rol oynayarak aktivitelerini değiştirir (Fritz, 2000; Fritz ve diğ., 2003). Ayrıca birçok çevresel faktöre (kemo-radyoterapi ve ROT dahil) karşı hücresel adaptasyonun koordine edilmesinde önemli bir sinyal molekülü olarak rol oynar (Ramana ve diğ., 1998; Koukourakis ve diğ., 2001). Bu genin alternatif splicing ürünü olan AN34/Ape1 ise apoptotik hücre ölümü, iç yolak tarafından teşvik edildiğinde kaspaz 3 tarafından aktive edilen tripsin benzeri bir enzim tarafından kesilerek DNA'nın apoptoza özgü fragmentasyonuna sebep olmaktadır (Yoshida ve diğ., 2003).



Şekil 2.7. APEX proteininin organizasyonu

2.2.3.3. β -globin Gen Kümesi ve Nükleer DNA Hasarı

İnsan β -globin gen kümesi 11. kromozom üzerindeki ~45 kb'lık bir bölgede 5 foksiyonel (epsilon, gama G, gama A, delta, beta), 1 psödogen (psödo-beta-1) içerir (Efstratiadis ve diğ., 1980, Palstra ve diğ., 2003). Globin genlerinin anlatımı eritroid tipi hücrelerle sınırlı olup (Li ve diğ., 2001), epsilon ve 2 gama globin geninin anlatımı erken embriyonik ve fetal evrede, delta ve beta globin genlerinin anlatımı ise yetişkin evrede yapılır. HeLa hücrelerinde transkripsiyonel olarak inaktif olan bir gen kümesidir.

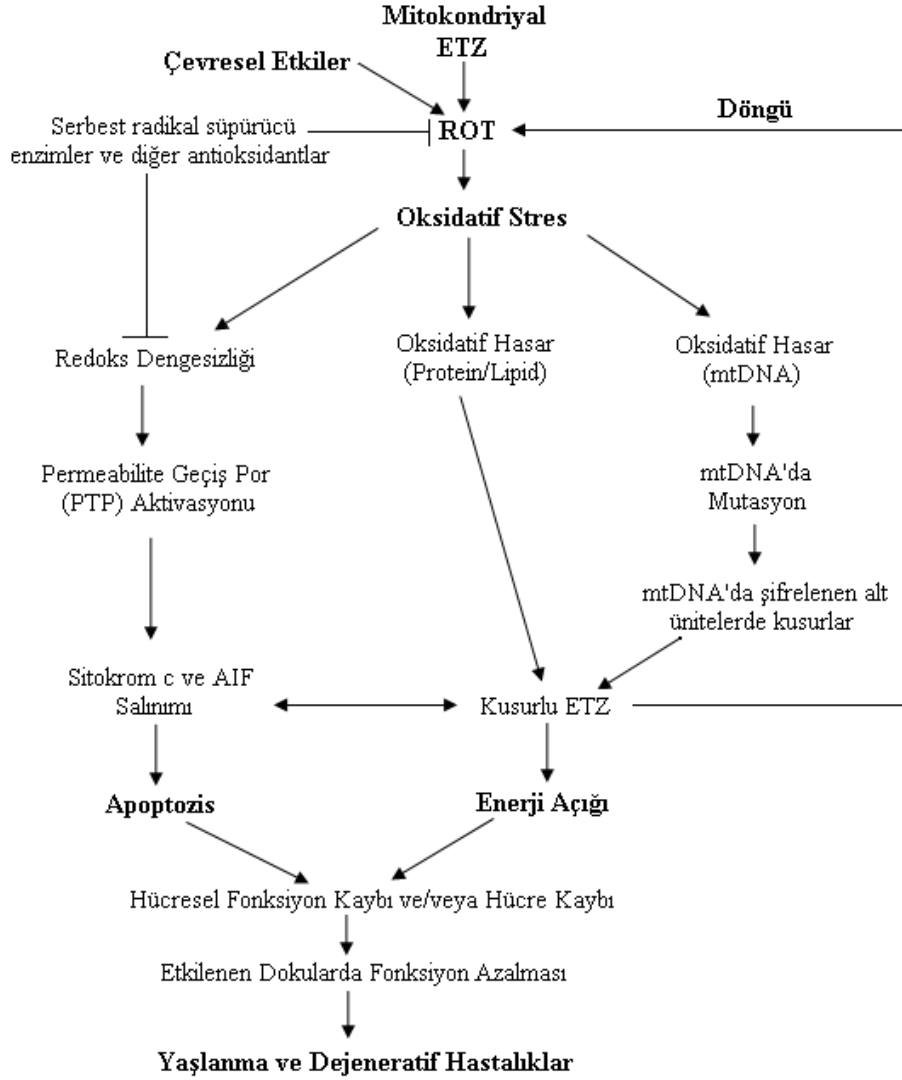
2.2.3.4. Oksidatif Streste Mitokondriyal DNA

Tipik memeli hücresi en az 100- 1000 kopya mitokondriye ve her bir mitokondri 2-10 kopya genoma sahiptir. Mitokondri ETZ ile aerobik organizmalardaki enerji üretiminin merkezi ve elektron sızıntılarından dolayı da büyük bir ROT kaynağıdır (Wei ve Lee, 1998). Kapalı çembersel formdaki 16569 nükleotid uzunluktaki mitokondri genomu 13 polipeptit, 22 tRNA ve 2 rRNA şifreleyen toplam 37 gene sahiptir. mtDNA tarafından şifrelenen 13 polipeptit ETZ ve ATP sentaz'ın temel alt birimlerini oluşturur (Anderson ve diğ., 1981).

mtDNA'nın ROT ve çeşitli kanserojenlere karşı nDNA'ya göre 2-3 kat daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Yakes ve van Houten, 1997). mtDNA'nın nükleoprotein korumasından yoksun olması, mitokondriyal iç zar ile ilişkisi ve ETZ kaynaklı oksidatif strese daha fazla maruz kalması oksidatif hasarlara olan duyarlılığını açıklamaktadır (Maynard ve diğ. 2009). Memelilerde mtDNA'nın onarımı Baz kesip- çıkarma onarım (BER) sistemi ile sadece küçük boyutlu hasarların onarımı şeklinde gerçekleştirilir. Büyük boyutlardaki hasarlar ise nükleotid kesip- çıkarma onarım (NER) sistemi olmadığı için onarılamaz. mtDNA'da oksidatif stres sonucu meydana gelen hasarlar ve bu hasarlarla ilişkili olarak gelişen mitokondriyal fonksiyon kaybı ile kanser, yaşlanma ve özellikle dejeneratif hastalıklar arasında önemli bir ilişki olduğu birçok *in vitro* çalışmada ve hayvan modelleri ile yürütülen çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.8) (Wei ve Lee, 1998; Mandavilli ve diğ., 2002; van Houten ve diğ., 2006; Maynard ve diğ., 2009). Bu ilişki "mitokondriyal katastrof hipotezi" olarak adlandırılır (van Houten ve diğ., 2006).

Yüksek oksidatif stres ve yaşlanma ile birlikte mtDNA'da gerçekleşen oksidatif modifikasyonlar ve mutasyonlar, transkripsiyonu ve translasyonu yapılan genlerin ürünlerindeki fonksiyon bozuklukları ETZ'nin fonksiyon görememesine veya kusurlu proteinlerden ötürü daha fazla ROT oluşumuna ve hücrede enerji açığına sebep olabilir. Ayrıca hücre içindeki yüksek ROT miktarı redoks dengesinin bozulmasına ve apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesine de sebep olabilir (Nekhaeva, 2002). Artan apoptoz ile birlikte yaşlanma sürecinde dokudaki (özellikle mitotik aktivitesini yitirmiş ve kas gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokulardaki) hücrelerin hem biyokimyasal hem de fizyolojik fonksiyonlarında azalma gerçekleşir (Wei ve Lee, 1997). Sonuçta yaşlanma ve yaşlanma

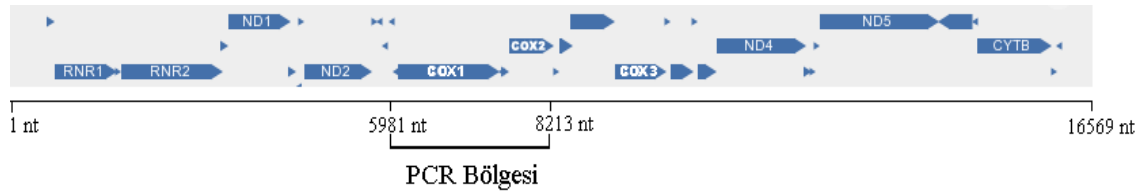
ile ilgili dejeneratif hastalıklar gelişir (Sawyer ve van Houten, 1999). Bu olası süreçten dolayı mtDNA hasarının ROT ile ilgili hastalıklar için kullanışlı bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Yakes ve van Houten, 1997).



Şekil 2.8: Mitokondrinin yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif hastalıklardaki rolü (AIF: Apoptozu uyarıcı faktör) (Wei ve Lee, 1997).

ETZ'deki son oksidaz olan kompleks IV (sitokrom-c oksidaz, sitokrom a₃, ferrositokrom c oksidaz, indofenol oksidaz) sitokrom c'nin oksidasyonunu ve O₂'nin suya redüksiyonunu katalizler. Tümü sitoplazmik ribozomlarda sentezlenip mitokondriye taşınan; 13 alt ünitesiden 3'ü büyük boyutlu katalitik alt üniteler olup mtDNA'da (COX I, II ve III) ve 10 alt ünitesi ise nDNA'da şifrelenir (COX IV, Va, Vb,

VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc ve VIII). Alt üniteler içinde en iyi korunmuş olanlar COX I ve COX II'dir (Michel ve diğ., 1998) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Sitokrom c oksidaz enziminin altbirimlerini şifreleyen genlerin (COX genleri) mitokondri genomundaki yerleşim düzeni.

2.2.3.5. Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi

Oksidatif ajanların meydana getirdiği DNA hasarlarının belirlenmesinde çeşitli tekniklerden yararlanılmaktadır (Jaruga ve Dizdaroğlu, 1996; Beackman ve Ames, 1997; Dieana ve diğ., 1999; Ayala-Torres ve diğ., 2000; Dizdaroğlu ve diğ., 2002).

Bunlar arasında en çok kullanılanlar:

1. Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (GC-MS),
2. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS),
3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (HPLC-MS),
4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Quantitative Polymerase Chain Reaction” QPCR),
5. COMET (Tek-Hücre Jel Elektroforezi) analizi,
6. Southern melezleme (blotting),
7. HPLC-ED (Elektrokimyasal saptama),
8. Doku veya boşaltım sisteminden salınan onarım atıklarının ölçülmesi,
9. Kantitatif ELISA
10. İmmünohistokimyasal analizdir.

Bu teknikler içinde DNA hasarının gene özgü olarak belirlenmesine olanak veren yalnız QPCR ve Southern melezleme teknikleridir. QPCR çok daha hızlı ve 3-5 kat daha duyarlı olduğu için genellikle tercih edilir (Sawyer ve van Houten, 1999). Gene-özümlü QPCR analizi; Taq DNA polimerazın çalışmasını bloke edecek herhangi bir ajanın DNA üzerindeki etkisinin incelenmesine veya onarım kinetiklerinin belirlenmesine olanak sağlar (Wang ve diğ., 2003; Ayala-Torres ve diğ., 2000). H₂O₂ zincir kırıkları,

baz modifikasyonları ve bazsız bölgeler gibi birçok farklı oksidatif DNA hasarına neden olur (Dizdaroğlu, 2002). Bu hasarların pek çoğu DNA polimerazın iş görmesini engeller (Yakes ve van Houten, 1997) ve böylece H₂O₂ tarafından oluşturulan hasarların büyük bir kısmı QPCR analizi ile belirlenebilir.

QPCR analizinde hasarın belirlenebilmesi için doğru döngü sayısının seçilmesi çok önemlidir (Yakes ve Van Houten, 1997). Bunun için DNA kalıp miktarının sabit tutularak, tek kopyalı bölgeler için 20- 30 döngülük, mitokondri gibi çok kopyalı bölgeler için 10-20 döngülük reaksiyonlar yapılarak ürün miktarının döngü sayısı ile beraber üssel olarak artış gösterdiği görülmelidir (Ayala-Tores ve diğ., 2000; Grimaldi ve diğ., 2002). Döngü sayısına bağlı olarak ürün miktarının üssel artış gösterdiği grafiklerde her bir bölge için ürün miktarının kolay ve başarılı bir şekilde ölçülebileceği ekponansiyal artışın olduğu döngülerden biri seçilmelidir (Yakes ve van Houten, 1997). Daha sonra belirlenen döngü sayısında PCR ürün miktarının kalıp miktarı ile doğru orantılı olarak değiştiğini görmek ve uygun kalıp derişimine karar vermek için 12.5-200 ng kalıp DNA içeren PCR'lar yapılır ve ürün miktarının kolay ve başarılı bir şekilde ölçülebileceği bir kalıp miktarına karar verilir. Ürünlerin miktarları dolaylı olarak otoradyografların, agaroz jel'in veya agaroz jel fotoğraflarının densitometrik analizi yoluyla veya doğrudan radyasyonun ölçülmesi veya fluorometrik olarak belirlenebilir (Grimaldi ve diğ., 2002). Sonuçta hedef dizinin PCR ürün miktarındaki azalma dizideki hasarların bir sonucu olup, elde edilen ürünün miktarlarının *Poisson* denkleminde ($\lambda = - \ln (A_d/ A_k)$) yerine konulması ile dizideki hasar frekansları belirlenebilir.

QPCR tekniği ile çeşitli hücre kültür sistemlerinde, farklı genlerde farklı genotoksik ajanların oluşturduğu DNA hasarları belirlenmiştir. Genotoksik ajan olarak H₂O₂, hipoklorit (HOCl), peroksinitrit (ONOO⁻), UV, sisplatin, nitrokuinolin (NQO) ve kuinakrin en sık kullanılan ajanlar olup, genellikle transforme veya normal fibroblast hücreleri, lenfosit ve lösemi hücreleri, kolon hücreleri, adenoma hücreleri, değişik kökenli epitel hücreleri (HeLa) vb. hücrelerle çalışılmıştır. Gen olarak β -globin, hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz (HPRT), DNA polimeraz β , dihidrofolat redüktaz (DHFR), p53, nöroblastoma ras onkogeni (N-ras), LDL reseptör geni, insan büyüme hormonu geni ve en çok da mtDNA'daki çeşitli bölgelerdeki hasarlar

belirlenmiştir (Govan ve diğ., 1990; Grimaldi ve diğ., 1994; McCarthy ve diğ., 1996; Duthie ve diğ., 1997; Salazar ve van Houten, 1997; Ballinger ve diğ., 1999; Denissenko ve diğ., 1999; Deng ve diğ., 1999; Ballinger ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2003; Santos ve diğ., 2003; Sawyer ve diğ., 2003; Bennetts ve Aitken, 2005; Çakır ve diğ., 2007; Bennetts ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2008).

Bazı çalışmalarda, tüm DNA'da oluşan kırıkların veya belli hasar türlerinin (örneğin, alloksan, timin glikol, sitozin glikol, oksazolun, 8-hidroksiadenin, 8-hidroksiguanin vb.) GC-MS, LC-MS (Hui-Lian ve diğ., 2003; Watson ve diğ., 2003; Dizdaroğlu ve diğ., 2002, Dieana ve diğ., 1999; Dizdaroğlu, 1993) veya diğer belirtilen teknikler ile (Duthie ve diğ., 1997; Rao ve diğ., 1998; Salles ve diğ., 1999; Ichihashi ve diğ., 2000; Budiyanto ve diğ., 2000; Collins ve Horvathova, 2001; Sawyer ve diğ., 2003; Wang ve diğ., 2008) analizi yapılmıştır.

2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNE KARŞI SAVUNMA MEKANİZMALARI

Aerobik organizmalar oksidatif stresin zarar verici etkilerinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Shackelford ve diğ., 2000). Bu temel mekanizmalar antioksidanlar ve onarım sistemleri tarafından yürütülür.

2.3.1. Antioksidanlar

Oksitlenebilir substrata oranla daha düşük derişimde bulunan ve substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen bileşikler genel olarak “**antioksidan**” olarak tanımlanmaktadır. Tek başına etki gösteren *in vivo* bir antioksidan yoktur. Antioksidanlar, etki edecekleri reaktif türün tipine ve buldukları hücrel ortama göre değişik etkileşimlerle iş görürler. Oksitlenen substrat lipid, DNA, protein veya başka bir biyomolekül olabilir. Hücrel antioksidanlar üç temel grupta ele alınabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2003):

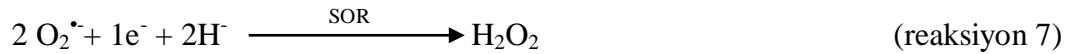
1. Antioksidan enzimler: Reaktif türlerin yıkımını katalizleyen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, peroksiredoksin ve glutasyon peroksidaz gibi enzimlerdir.

2. Zincir kıran antioksidanlar: Elektron alınması veya verilmesi şeklinde gerçekleşen zincirleme reaksiyonları bozan; glutatyon, karotenoidler, kateşinler, ubikinol, askorbik asit (C vitamini) ve tokoferol (E vitamini) gibi moleküllerdir.
3. Metal bağlayan proteinler: Metal iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşturmalarını engelleyen; transferrin, laktoferrin ve seruloplazmin gibi proteinlerdir.

2.3.1.1. Antioksidan Enzimler

Ökaryotik hücrelerdeki, $O_2^{\bullet-}$ metal içeren iki SOD izoenzimi (mitokondriyal Mn-SOD ve sitozolik Cu/Zn-SOD) tarafından metabolize edilir (Halliwell ve Gutteridge, 2003). Bakterilerde ise genelde Mn-SOD ve Fe-SOD bulunur (Yost ve Fridovich, 1973); aynı zamanda Cu/Zn-SOD içerenleri de vardır (Fridovich, 1997). SOD tarafından katalizlenen reaksiyon ile iki $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve O_2 'ne dönüştürülür (reaksiyon 1). Dolayısıyla bu reaksiyon hücrel bir hidrojen peroksit kaynağıdır.

Süperoksitin doğrudan indirgenmesini katalizleyen diğer bir enzim de süperoksit redüktaz (SOR)'dır. Demir içeren bu enzim, $O_2^{\bullet-}$ radikalının tek elektron alarak H_2O_2 'e indirgenmesini katalizler (reaksiyon 7) ve şimdiye kadar sadece anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerde (desülforedoksin), anaerobik arke *Pyrococcus furiosus*'da ve sifilis (bel soğukluğu) etmeni olan mikroaerofilik bakteri *Treponema pallidum*'da tanımlanmıştır. *T. pallidum*, SOD taşımaz ve süperoksit eliminasyonunu tamamen SOR ile gerçekleştirir. Şimdiye kadar hiçbir memelide SOR'a rastlanmamıştır (Adams, 2002).

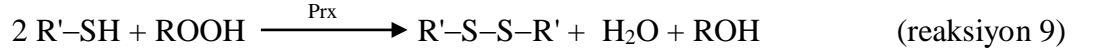


Temelde hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu (reaksiyon 3) katalizleyen katalaz enzimi *hem* grubu içeren monomerik bir enzimdir (Aebi, 1974). Memeli hücrelerinde en çok peroksizomlarda bulunur. Katalazın, fenol ve alkol gibi farklı substratları detoksifiye etme işlevi de vardır. Bu reaksiyonu, hidrojen peroksidin indirgenmesiyle birlikte gerçekleştirir (reaksiyon 8):

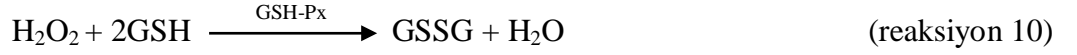


H₂O₂'i bu şekilde tüketen katalaz, Fenton reaksiyonu ile H₂O₂'den hidroksil radikali oluşumunu azaltarak dolaylı bir antioksidan etki gösterir (Halliwell,1999). Ayrıca katalaz enziminin kendisini inaktive olmaktan koruyan ve etkinliğini artıran NADPH'a bağlanarak iş gördüğü de bilinmektedir (Kirkman ve Gaetani, 1984).

Peroksiredoksinler (Prx; tiyoredoksin peroksidazlar), H₂O₂ ve farklı alkil hidroperoksitler gibi peroksitlerin doğrudan indirgenmesini (reaksiyon 9) sağlayan enzimlerdir (Chae ve diğ., 1999). Bugüne kadar, en az 13 memeli peroksiredoksini tanımlanmıştır (Butterfield ve diğ., 1999).



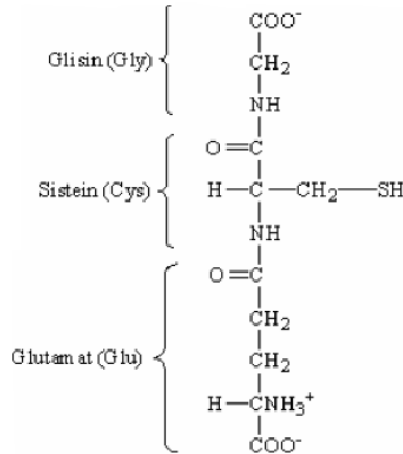
Glutasyon peroksidazlar (GPx), glutasyonu substrat olarak kullanarak peroksitlerin indirgenmesini katalizyen enzimlerdir (reaksiyon 10-11) (Forstrom ve diğ.,1979). Memelilerde, her biri selenosistein içeren, en az dört farklı tip GPx (GPx 1- 4) bulunmaktadır. GPx1 ve GPx4 (veya fosfolipit hidroperoksit GPx), birçok dokuda sıkça rastlanan sitozolik enzimlerdir (Ursini ve diğ., 1995).



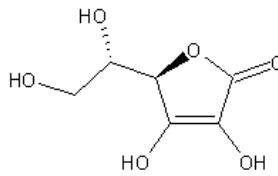
2.3.1.2. Zincir Kıran Antioksidanlar

Glutasyon hücrede çok sayıda önemli işlevi bulunan, tripeptit (L-γ-glutamil-L-sisteinil glisin) yapıda bir tiyol bileşiğidir (Şekil 2.10). Hücre içindeki derişimi milimolar düzeyde olan glutasyonun, reaktif oksijen türlerinin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundaki rolü iyi bilinmektedir (Therond ve diğ., 2000). Ayrıca oksidatif strese karşı önemli koruyucu etkiye sahip olan glutasyon peroksidaz gibi çeşitli enzimlerin de koenzimi olarak görev yapar (Forstrom ve diğ.,1979).

C vitamini suda çözünen, güçlü bir zincir kıran antioksidandır (Şekil 2.11). Süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorik asit, peroksil radikalleri, singlet oksijen gibi birçok suda çözünen radikal ve oksidana elektron aktarma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, sıvı-lipit ara yüzeyinde E vitamininin rejenerasyonunu da sağlar (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

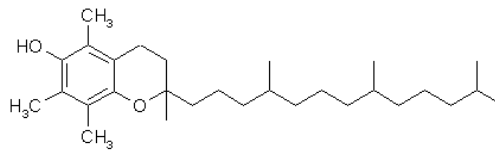


Şekil 2.10: Glutatyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin)'un kimyasal yapısı



Şekil 2.11: C vitamininin kimyasal yapısı.

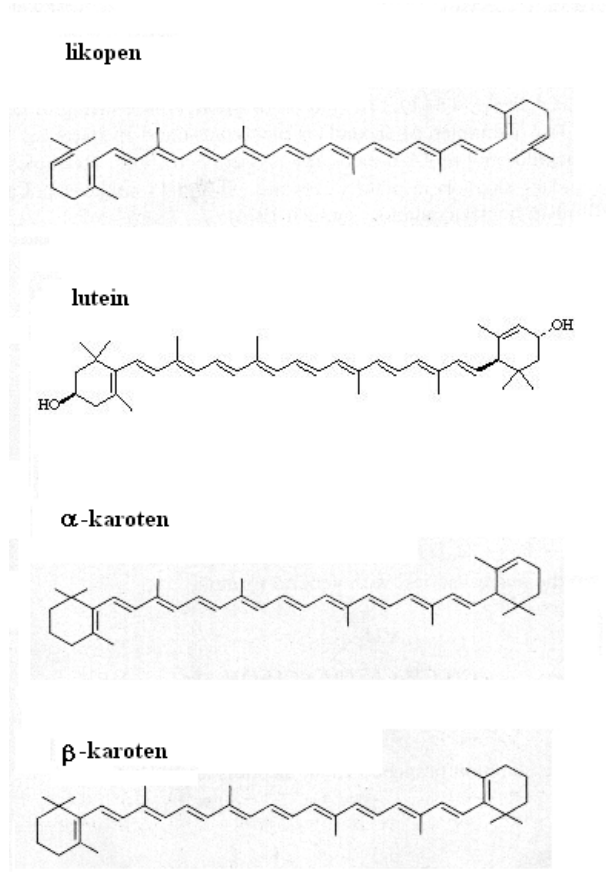
E vitamininin 8 formu bulunmaktadır: α , β , γ , δ - tokoferoller ve α , β , γ , δ - tokotrienoller. Tüm formlar, antioksidan işleve sahiptir, ancak α - tokoferol (Şekil 2.12), hücre zarlarında ve lipoproteinlerdeki en kuvvetli yağda çözünen zincir kıran antioksidan olarak bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).



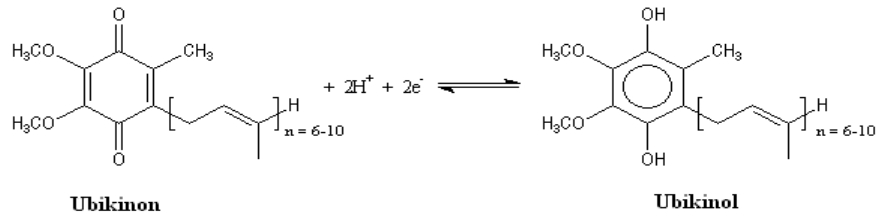
Şekil 2.12: E vitamininin kimyasal yapısı

Bitkilerdeki farklı renkteki pigmentleri içeren karotenoidler, α -karoten, β -karoten, likopen ve luteini de içeren bir gruptur (Şekil 2.13). Bugüne kadar, 600'den fazla karotenoid tanımlanmıştır. Yağda çözünen bu antioksidanlar, singlet oksijenin ve sadece düşük oksijen basıncında peroksil radikalının etkili radikal süpürücüleridir (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

Ubikinonlar (koenzim Q10), mitokondrideki ETZ'nin önemli yapıtaşlarıdır. Lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini inhibe ederler (Frei ve diğ., 1990). Antioksidan formu, ubikinonun indirgenme ürünü olan ubikinoldür (Şekil 2.14) (Mohr ve diğ., 1992). Doğrudan antioksidan etkilerine ek olarak, α -tokoferol gibi yağda çözünen diğer antioksidanların da rejenerasyonunda iş görmektedirler (Ernster ve diğ., 1992).



Şekil 2.13. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları



Şekil 2.14. Ubikinonun ubikinole indirgenmesi

2.3.1.3. Metal Bağlayan Proteinler

Demir bağlayan proteinler olan transferrin ve laktoferrin ile bakır bağlayan protein seruloplazmin, metal bağlayan proteinler olarak gruplandırılır. Bunlar serbest halde bulunan geçiş grubu metal iyonlarını bağlayarak bu metal iyonlarının serbest radikal oluşumuna katılmalarını engellerler (Halliwell ve Gutteridge, 2003).

2.3.2. Onarım Sistemleri

2.3.2.1. DNA Onarım Sistemleri

Genetik materyaldeki hasarların onarılması genomik stabilitenin devamlılığı için şarttır. Kimyasalların ve radyasyonun genomun farklı bölgelerinde meydana getirdiği hasarların çeşitli tipte olduğu ve onarım mekanizmalarının da değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (Wang ve diğ., 2003). DNA hasarları tipine, boyutuna ve hasarı yapan ajanın türüne göre farklı DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. İnsanda ~130 DNA onarım enzimi bulunur (Christmann ve diğ., 2003). Bu genlerin bir kısmı DNA onarımının düzenlenmesi ve sinyal sistemiyle, bir kısmı ise onarım mekanizmaları ile doğrudan ilgilidir. DNA'ya hasar veren ajanlar çoğunlukla farklı tiplerde hasar oluşturduğu gibi bir hasar tipine cevapta da birden fazla onarım sistemi görev alır. Bu düzenleme hücrenin onarım sisteminde bir aksama (bir enzimin inaktive olması gibi) olduğunda diğer bir onarım sisteminin işlemesi ile hasarın onarımını sağlayabilir, fakat bu her zaman geçerli değildir (Yu ve diğ., 1999). DNA onarımı ile ilişkili genlerdeki mutasyonların tümör gelişimi (kalıtsal polipozal olmayan kolon kanseri, meme kanseri, cilt kanseri) ve kompleks metabolik değişimlerin görülmesi ile tanımlanan çeşitli kalıtsal hastalıklarla (ksenoderma pigmentosum, ataksia telangiektasiya, fankoni anemisi vb) ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Papadopoulos ve diğ., 1994; Vermeulen ve diğ., 1997; Savitsky ve diğ., 1995; Joenje ve Patel, 2001). Memelilerde DNA onarım sistemleri başlıca 5 gruba ayrılır (Yu ve diğ., 1999; Wood ve diğ., 2001).

- **Doğrudan Onarım:** DNA hasarına en basit yanıt olup tek adımlı bir reaksiyon ile hasarlı molekül çıkarılarak onarım gerçekleştirilir. Örneğin maya ve bakterilerde fotolizazlar ışık bağımlı bir reaksiyonla UV etkisiyle oluşan hasarları doğrudan onarabilir. İnsanlarda ise MGMT (O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz) doğrudan onarım enzimi olarak görev yapar ve alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan

hasarlardaki alkil gruplarını kendine bağlayarak onarımı gerçekleştirir. Bu enzimin aktivitesindeki azalma alkilleyici ajanlara olan direnci azalttığından, özellikle alkilleyici ajanların neden olduğu beyin tümörlerinin gelişiminde önemli bir faktördür (Yu ve diğ., 1999).

- **Çift zincir kırıklarının onarımı:** Çift zincir kırıkları somatik rekombinasyon gibi normal fizyolojik süreçlerde meydana gelebileceği gibi oksidatif stres sonucu veya iyonize radyasyon tarafından da oluşturulabilir ve replikasyon ve/veya transkripsiyonun durmasına sebep olur. Bu onarımın etkin bir şekilde yapılması lokal ve tüm genomun bütünlüğünün devamlılığı ve gen anlatımının sürdürülebilmesi için şarttır.
- **Hatalı eşleşme onarımı:** Hatalı baz çiftleri, replikasyon sırasında yanlış baz girişlerinin olması veya 5-metil sitozinin deaminasyon reaksiyonu sonucunda urasile dönüşmesiyle meydana gelebilir. Bu onarım kısa-yama (1-2 nükleotid için) ve uzun-yama (90-170 nükleotid için) olarak iki tiptir.
- **Nükleotid kesip çıkarma onarımı (Nucleotide Excision Repair, NER):** Bu onarım sistemi sisplatin ve prosalen gibi maddelerin ve UV'nin oluşturduğu büyük boyutlu hasarların onarımını gerçekleştirir. Oldukça karmaşık bir onarım sistemi olmakla beraber onarım; hasarın tanınması, kesim, kesim sonrası oluşan boşluğun doldurulması ve ligasyon aşamalarını içerir.
- **Baz kesip-çıkarma onarımı (Base Excision Repair, BER):** Bu onarım sistemi alkilleyici ajanlar ve oksidatif ajanların gerçekleştirdiği metilasyon, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucunda oluşan küçük hasarların onarımını gerçekleştirir (Frosina, 2000; Ronen ve Glickman, 2001; Bohr ve diğ., 2002). Böylece hücreyi dışsal ve içsel kaynaklı birçok ajanın toksik ve mutajenik etkisine karşı korur (Bohr, 2002). Bu onarımın kısa-yama (1 nükleotid onarır) ve uzun-yama (2-13 nükleotid onarır) olarak iki tipi vardır. Fakat ikisi de temel olarak 5 aşamada gerçekleşir (Şekil 2.15) (Christmann ve diğ., 2003):

1. Hasarlı bazın tanınması, çıkarılması, zincirin kesilmesi: Hasarlı baz DNA glikozilaz tarafından tanınır ve şeker fosfat omurgası ile baz arasındaki glikozidik bağ kesilerek çıkarılır. DNA glikozilazların Tip I ve Tip II olarak adlandırılan iki alt grubu ve memelilerde farklı substrat özgüllüğü ve aktivitesi olan 11 farklı çeşidi vardır. Bazsız bölgenin şeker fosfat omurgasının fosfodiester bağı APEX enzim

aktivitesi veya glikozilazın AP-liyaz aktivitesi ile kesilerek 3'-OH ve 5'-bazsız şeker fosfat grubu oluşturulur.

2. İlk nükleotidin eklenmesi: İlk nükleotidin eklenmesi bazsız bölgenin yapısına bağlı değildir ve DNA polimeraz β (Pol β) tarafından gerçekleştirilir.
3. Kısa-yama veya uzun-yama seçimi: Bu seçim bazsız bölgenin kimyasal yapısına bağlıdır. Oksitlenmiş veya redüklenmiş bazsız bölgeler, 3'-fosfatlar ve 3'-doymamış aldehitlerde 5'-deoksiriboz-5-fosfat (5'dRP) Pol β tarafından kesime dirençlidir. Bunların onarımı proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) bağımlı uzun-yama onarımı ile gerçekleşebilir. 8-oxoG gibi hasarların onarımı ise kısa-yama BER ile gerçekleşir ve genel olarak hasarların yalnız % 25'i uzun-yama BER ile onarılmaktadır (Dianov ve diğ., 1998).
4. Zincirin yerinden çıkarılması ve DNA sentezi: Seçime göre, kısa-yama onarımı yapılacaksa Pol β 'nın 5'dRPaz aktivitesi ile 5'dRP kesilip çıkarılır. Uzun-yama onarımında ise tek bazın Pol β tarafından çıkarılıp DNA omurgasının kapatılmasının yanında ek adımlara ihtiyaç vardır. PCNA ve replikasyon faktörü c (RF-C) ile birlikte Pol ϵ , Pol δ aktivitesi ile uzun bir DNA sentezi yapılır. Sentez sonrası 5'dRP'nin ayrılması PCNA tarafından teşvik edilen kanat (flap) endonükleaz 1 (FEN1) tarafından gerçekleştirilir.
5. Zincirlerin birbirine bağlanması: DNA ligaz I, Pol β ve PCNA ile, DNA ligaz III ise Pol β ve PARP-1 [poli(ADP-riboz) polimeraz-1] ile birlikte bu reaksiyonu gerçekleştirir.

BER'in düzenlenmesinde p53 önemli bir rol oynar. *In vitro*'da p53'ün APE ve Pol β ile doğrudan ilişki kurarak BER'i stimüle ettiği belirlenmiştir (Zhou ve diğ., 2001) ancak *in vivo*'da BER düzenlemesi tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

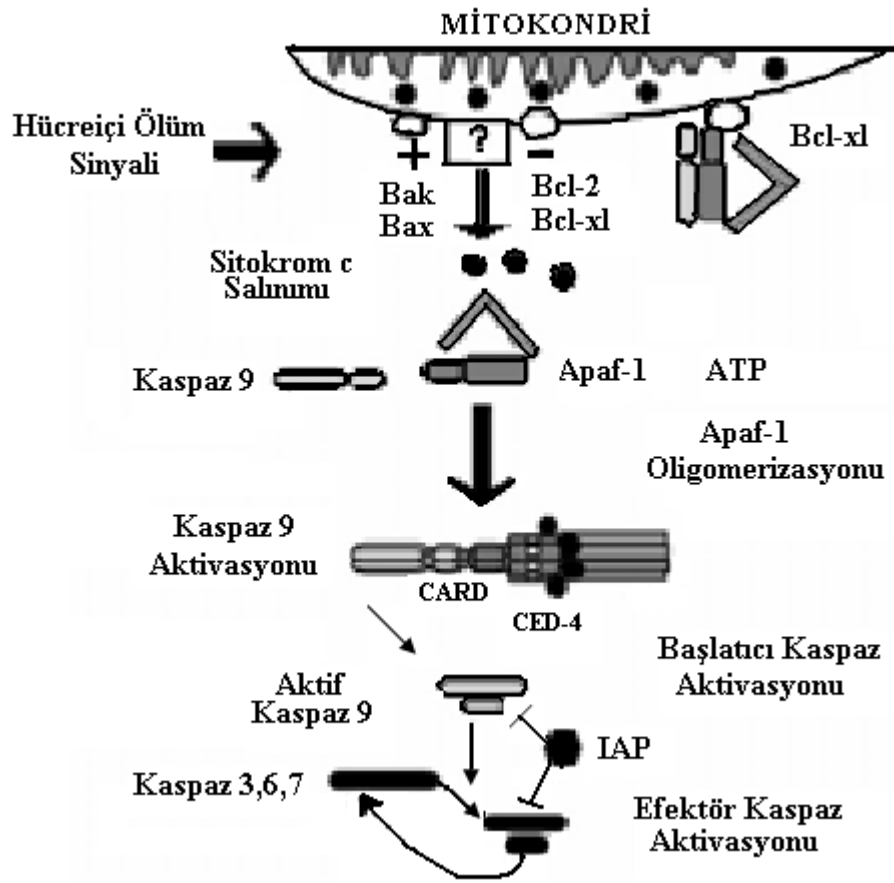
ve L-izoaspartil protein karboksil metiltransferaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir (Gothel ve Marahiel, 1999; Stadtman ve diğ., 2002).

2.4. OKSİDATİF STRES VE APOPTOZ

Oksidatif strese karşı hücrenin cevabı şu sırayla gerçekleşir: a- DNA'nın onarımı, b- DNA onarımına zaman tanımak ve hasarlı DNA'nın bölünme yoluyla yayılımını engellemek için hücre döngüsünde gecikme, c- transkripsiyonel cevap ve d- hasarların onarılamaması durumunda apoptozun teşviki (Sancar ve diğ., 2004; Maynard ve diğ., 2009). Apoptoz biyokimyasal ve morfolojik olarak özel süreçleri bulunan, kompleks organizmalarda hasarlı veya zararlı hücrelerin yok edilmesi, doku homeostazisinin korunması ve embriyonik evrede organ gelişimi için gerekli bir süreçtir (Reed, 2000). Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda ortaya çıkabilir. Apoptotik hücre ölümü süreci başladığında hücre şeklinde yüzey adezyonunun kaybindan kaynaklanan bir yuvarlaklaşma olduğu görülür. Daha sonra komşu hücrelerle temasın kaybolduğu, hücre hacminin azaldığı, kromatinin nukleus zarına yaklaşarak yoğunlaştığı, plazma zarında kabarcık şeklinde yapıların oluştuğu ve son olarak "apoptotik cisimcik" olarak adlandırılan hücre parçacıklarının meydana geldiğinin görülmesi ile ölüm gerçekleşir (Reed, 2000). Apoptoz birçok molekülün yer aldığı karmaşık bir süreçtir ve çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Apoptoz hücre içinden veya dışından kaynaklanan birçok uyarıcı (DNA hasarı, sitotoksik maddeler, radyasyon, viral enfeksiyonlar, metabolik veya hücre siklusundaki karışıklıklar, canlılık sinyallerinin kaybolması, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivitesi) ile teşvik edilebilir. Bütün sinyaller ölüm reseptörü bağımlı dış yolak veya mitokondri bağımlı iç yolak aracılığıyla sonuçta kaspaz aktivasyonunu sağlar ve apoptozu teşvik eder.

Mitokondri, dış yolak kökenli sinyallerin akışı yanında hücre içi yolağın işleyişinde merkezi bir rol oynar. DNA hasarı, oksidatif stres, radyasyon, kemoterapi ilaçları tarafından oluşturulan sinyaller ve metabolik veya hücre siklusundaki karışıklıklar bu yolak tarafından apoptozu teşvik eder (Zamzami ve Kroemer, 2001). Mitokondriye ulaşan ölüm sinyali zar geçirgenliğinde değişime ve bu değişimde sitosole sitokrom-c ve diğer pro-apoptotik proteinlerin salınmasına neden olur (Şekil 2.16). Sitosole salınan sitokrom-c "apoptozom" kompleksinin oluşumunu sağlayarak **kaspaz 9**'u aktive eder.

Kaspaz 9 ise kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır. Kaspazlar sistein proteazlar olup inaktif proenzim olarak sentezlenirler ve oligomerizasyon ve proteolitik kesim yoluyla aktive olurlar (Reed, 2000). Kaspazların substratları arasında, kesim sonucu aktive veya inaktive olan apoptozu düzenleyici proteinler (diğer kaspazlar), hücre için temel olan enzimler (örneğin, DNA sentez veya onarımı ile ilgili enzimler), protein kinazlar ve diğer sinyal iletim düzenleyicileri, sitosolik ve nükleer yapısal proteinler ile hücre siklusunu düzenleyen proteinler yer alır (Nunez ve diğ., 1998). H₂O₂ uygulaması sonucu oluşan oksidatif stresin, HeLa hücrelerinde mitokondri bağımlı iç yolak aracılığı ile apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir (Singh ve diğ. 2007). HeLa hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün p73 ve pro-apoptotik Bax proteininin aktivasyonu ve anti-apoptotik Bcl-xl'nin inaktivasyonu yolu ile gerçekleşir (Singh ve diğ., 2007).



Şekil 2.16: Mitokondri bağımlı iç yolağın işleyişi.

Mitokondri bağımlı iç yolağın kontrolü ve düzenlenmesinde bcl-2 protein ailesine üye olan çok sayıda pro- ve anti-apoptotik protein görev almaktadır (Hu ve Kavanagh, 2003)

Apoptozun, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesine üye olan ölüm reseptörleri ile dış sinyallere cevap olarak indüksiyonu için, reseptörün özel ligandı ile birleşip aktive olması gerekir. En iyi bilinen ölüm reseptörleri TNFR-1, ölüm reseptörü 4 (DR4) ve ölüm reseptörü 5 (DR5)'tir (Fischer ve Schulze-Osthoff, 2005). Aktive olan reseptör ölüm tetikleyici sinyal kompleksinin (DISC) oluşumunu sağlamaktadır. DISC doğrudan pro-kaspaz 8'in aktive edilmesini, o da hücrel substratların kesiminden sorumlu Kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonunu sağlamaktadır (Nunez ve diğ., 1998, Hu ve Kavanagh, 2003).

2.5. DOĞAL ANTIOKSIDANLAR VE ZEYTİNYAĞININ BİYOLOJİK ETKİLERİ

Epidemiyolojik çalışmalar antioksidan bileşimi fazla olan besinler ve meyve/sebze ağırlıklı beslenmenin dejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser türlerinin görülme sıklığını azalttığını ortaya koymuştur (Duthie ve diğ., 1997; Elliott ve diğ., 2000; Collins ve Horvathova, 2001; Hui-Lian ve diğ., 2003).

Bazı doğal ürünlerin, özellikle havuç suyu, kekik suyu, zeytinyağı, kakao yağı, soya yağı ve ayçiçeği yağı gibi bitkisel besinlerin (Visioli ve diğ., 1998; Wei ve diğ., 1996; Visioli ve diğ., 2002a; Visioli ve diğ., 2002b; Hui-Lian ve diğ., 2003; Garcia-Alonso ve diğ., 2007; Martin ve diğ., 2008) ve E vitamini, tirozol, hidroksitirozol, kesretin, mirsetin ve koenzim Q10 gibi bileşiklerin (Huertas ve diğ., 1999; Abalea ve diğ., 1999; Collins ve Horvathova, 2000; Visioli ve diğ., 2002a; Quiles ve diğ., 2002b; Vayalil ve diğ., 2003; D'Angelo ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 2010) antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleriyle oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı bildirilmektedir. Farklı bitkisel kaynaklardan elde edilmiş fenolik bileşiklerin de, örneğin, kesretin, resveratrol, mirsetin, kaffeik asit, rozmarinik asit, vanilin, kurkumin ve kumarinin oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi farklı hücre tiplerinde *in vitro* olarak ortaya konulmuştur

(Duthie ve diğ., 1997; Abalea ve diğ., 1999; Collins ve Horvathova, 2001; Lima ve diğ., 2006).

Olea europea L. bitkisinin meyvelerinin fiziksel preslenmesi ile elde edilen saf zeytinyağı antioksidan maddeler bakımından oldukça zengindir (Tablo 2.3). Zeytinyağında bulunan minör bileşenlerden α - tokoferol ve β -karoten gibi vitaminler, fitosteroller, pigmentler, terpenik asitler, skualen, flavanoidler, tirosol ve diğer birçok fenolik bileşik bu etki bakımından öne çıkmaktadır (Visioli ve diğ., 2002a; Visioli ve diğ., 2002b).

Tablo 2.3: Zeytinyağının kimyasal bileşimi.

Bileşen	En çok bulunan tür	Miktar
Yağ Asitleri (Stefanoudaki ve diğ., 1999)	Oleik asit (C18:1)	% 55-83
	Palmitik asit (C16:0)	% 7.5-20
	Linoleik asit (C18:2)	% 3.5-21
Basit Fenoller (Servili et al., 1999; Visioli ve Galli, 1998)	Sekoiridoidler, tirosol, oleuropein, hidroksitirosol	9- 752.3 mg/ml
Lignanlar (Owen ve diğ., 2000)	(+)-pinoresinol, (+)-1-asetoksinpinoresinol	0.65- 99.97 mg/ml
Flavonoidler (Bouaziz ve diğ., 2005)	Luteolin, apigenin, kersetin	Belirlenmemiş
Karotenoidler (Boskou, 2002)	β -karoten, lutein	1- 20 mg/ml
Tokoferoller (Boskou, 2002)	γ - tokoferol, α - tokoferol	5- 300 mg/ml
Terpenoidler (Nenadis and Tsimidou, 2002)	Skualen	2.08- 6.52 g/ml
Fitosteroller (Boskou, 2000)	β -sitosterol, kampestrol	1- 2 g/ml

Zeytinyağında 9-800 mg/kg olarak bulunan fenolik bileşikler (Visioli ve Galli, 1998; Servili ve diğ., 1999), yağın hazırlandığı meyvelerin ait olduğu ağacın alttürüne, meyvenin olgunlaşma evresine (meyve olgunlaştıkça fenolik içerik düşer), ezme prosesine ve yağın saklanma koşullarına bağlı olarak çok farklı derişimlerde olabilir (Fagliano ve diğ., 1999; Rotondi ve diğ., 2004). Bu fenolik bileşikler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve zeytinyağına özel aromasını ve keskin tadını verir. Bunlardan en çok miktarda bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinenler kaffeik asit, oleuropein, gallik asit, tirosol ve hidroksitirosol'dür (Visioli ve diğ., 2002a, Bartsch ve diğ., 2002; Yoshino ve diğ., 2002). Bu çalışmada standart olarak kullanılan gallik asit saf zeytinyağında 0.1- 1.4 mg/kg bulunur (Coni ve diğ., 2000).

Bu fenolik bileşiklerin $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve reaktif azot türleri (RAT) üzerinde süpürücü etkisinin olduğu *in vitro* ve *in vivo* (Manna ve diğ., 1997; Visioli ve diğ., 1998; Puerta ve diğ., 2001) testlerle belirlenmiştir. Bunlardan hidroksitirozolün ve oleuropeinin, BHT (butilhidroksitoluen, sentetik bir antioksidan) ve E vitamininden (doğal bir antioksidan) daha etkili süperoksit ve HOCl süpürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Visioli ve diğ., 2002a).

Akdeniz bölgesinde koroner kalp hastalıkları ve belirli kanser türlerinin (prostat, göğüs ve kolon kanseri) az görülmesi, beslenmede zeytinyağının tercih edilmesiyle ilişkilendirilmiş olup sağlık üzerindeki bu yararlı etkisini sadece yüksek oleik asit içeriği ile değil, ayrıca yüksek vitamin ve vitamin olmayan antioksidan bileşenleriyle de ilişkili olduğu düşünülmektedir (Visioli ve diğ., 2002a). Zeytinyağının bu olumlu etkisini doğrudan DNA hasarını veya lipid peroksidasyonunu engelleyerek peroksidasyon ürünlerinin neden olduğu DNA hasarlarını engelleyerek gerçekleştirdiği ileri sürülmekte olup (Visioli ve diğ., 2000b; Bartsch ve diğ., 2002) bu etkinin nasıl meydana geldiği moleküler düzeyde tam olarak açıklanamamıştır. Zeytinyağında bulunan hidroksitirozolün LDL oksidasyonunu engelleyici etkisi ise *in vitro* (Fito ve diğ., 2000; Visioli ve diğ., 2002a) ve *in vivo* (Marrugat ve diğ., 2004; Covas ve diğ., 2006b; Gimeno ve diğ., 2007) çalışmalar ile belirlenmiştir.

Hidroksitirozolün kolon kanser hattı (Caco-2) hücrelerinde H_2O_2 'nin sitotoksik etkisini ve MDA düzeyinde yaptığı artışı engellediği (Manna ve diğ., 1997) ve nöronal hibridoma hücre hattında ONOO⁻ kaynaklı oksidatif hasar ürünlerinin miktarını azalttığı belirlenmiştir (Deiana ve diğ., 1999). İnsan prostat kanser hücre hattında tirozol, hidroksitirozol ve kaffeik asit uygulamasının oksidatif DNA hasarını doza bağlı olarak azalttığı ve hidroksitirozolün en etkin korumayı gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur (Quiles ve diğ., 2002a). Hidroksitirozolün, insan melanoma hücrelerinde UV-A uygulaması ile artan ROT sonucu meydana gelen protein hasarına ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (D'Angelo ve diğ., 2005). İnsan T-lenfotik hücre hattında H_2O_2 uygulanması sonucunda oluşan DNA hasarı üzerinde 30 dakikalık total fenolik fraksiyon uygulamasının oksidatif DNA hasarını önleyici bir etkiye sahip olduğu COMET analizi ile belirlenmiştir (Nousis ve diğ., 2005). Hepatokarsinoma (HepG2) hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada

hidroksitirosol'ün 4 veya 20 saatlik ön uygulamasının, tert-bütülhidroperoksit (t-BOOH) ile indüklenen oksidatif stres sonucu hücre içi ROT ve lipid peroksidasyon ürünü MDA miktarındaki artışı belirgin bir şekilde önlediği ortaya konulmuştur (Goya ve diğ., 2007). J774 A.1 makrofaj hücre hattında tirosol ve hidroksitirosol'ün hücre içine hızlı bir şekilde girdiği, ancak hidroksitirosol'ün 18 saat içinde kaybolduğu, tirosol'ün ise zamanla birikerek yüksek derişimlere ulaştığı ve her ikisinin de hücre içi ROT düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir (Di Benedetto ve diğ., 2007). İnsan periferik mononükleer kan hücreleri ve promiyelositik lösemi (HL60) hücrelerinde H₂O₂ ile birlikte hidroksitirosol, tirosol, oleuropein ve kaffeik asit gibi zeytinyağında bol miktarda bulunan saf maddelerin, saf zeytinyağı ve zeytin karasuyundan hazırlanmış fenolik ekstrenin oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarını yüksek oranda inhibe ettiği COMET analizi ile belirlenmiştir (Fabiani ve diğ., 2008). Ancak bu çalışmada H₂O₂ ile antioksidan maddeler eş zamanlı olarak uygulandığı için, elde edilen verilerin güvenilirliği azdır. Monosit hücre hattında yapılan bir çalışmada ise hidroksitirosolün, lipopolisakkarit uygulaması sonucu artan ROT ve NO düzeyini azalttığı ve GSH düzeyini yükselttiği belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2009). İnsan cilt keratinosit hücre hattına (HaCaT) UV-B öncesinde 20 dakikalık hidroksitirosol uygulaması yapılması ROT artışı ile 8-OHdG ve zincir kırıklarının oluşumunu önlemiştir (Guo ve diğ., 2010).

Zeytinyağının bileşiminde bulunan ve kolesterol sentezinde bir ara ürün olan triterpen yapısındaki skualen ile beslenmenin, sıçanlarda azoksimetan ile indüklenen kolon kanserine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Rao ve diğ., 1998). Zeytinyağı ile beslenmenin, kemoterapik bir ajan olan doksorubisinin intraperitoneal enjeksiyon yolu ile sıçanlara verilmesi sonucunda kemik iliğinde oluşan kromozom aberasyonu frekansı üzerinde azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür (Antunes ve Takahashi, 1999). UV uygulaması öncesi farelerin derileri üzerine uygulanan zeytinyağının cilt kanseri gelişimini hem azalttığı hem de geciktirdiği ve UV etkisiyle oluşan DNA hasarlarını azalttığı belirlenmiştir (Budiyanto ve diğ., 2000; Ichihashi ve diğ., 2000). Ancak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada zeytin, ayçiçeği veya hindistancevizi yağı ile beslenmenin karaciğerdeki eteno-DNA hasar oluşumu üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Eder ve diğ., 2006).

Fenolikçe zengin zeytinyağı tüketiminin üriner atıktaki 8-OHdG miktarını azalttığı ve plazmadaki okside olmuş LDL miktarını düşürdüğü belirlenmiştir (Weinbrenner ve diğ., 2004). Avrupa'daki 6 araştırma merkezi tarafından 200 kişi üzerinde gerçekleştirilen geniş kapsamlı bir çalışmada, 3 haftalık zeytinyağı tüketiminin HDL kolesterol düzeyini artırdığı ve okside LDL miktarını azalttığı belirlenmiştir (Covas ve diğ., 2006a). Menapoz sonrası dönemdeki 10 sağlıklı kadın üzerinde gerçekleştirilen bir çalışma, zeytinyağı tüketiminin (fenolik içeriği ile doğru orantılı olarak) okside DNA ve DNA'daki zincir kırıklarının temel düzeyini düşürerek oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Salvini ve diğ., 2006). Üç haftalık zeytinyağı tüketimi sonunda, zeytinyağının (düşük, orta ve yüksek fenolik içeriğe sahip olmasının bir etkisi olmaksızın) DNA'nın oksidasyon oranını düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca 344 kişi ile yapılan bu çalışmada, Kuzey Avrupalı kişilerde Merkez ve Güney Avrupalı kişilere göre DNA ve RNA oksidasyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın bölgeler arasındaki zeytinyağı tüketim miktarı ile ilişkili olduğu ve bu sonucun bazı kanser türlerinin görülme sıklığındaki farklılığı açıklayabileceği belirtilmiştir (Machowertz ve diğ., 2007). Bu 3 çalışmanın aksine, 3 hafta boyunca farklı fenolik içeriğe sahip zeytinyağları ile beslenmenin plazmadaki protein oksidasyonunun belirteci olan protein karbonil miktarı, lipid peroksidasyonunun belirteci olan lipid hidroperoksit ve MDA miktarı ve plazma antioksidan kapasitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (Vissers ve diğ., 2001). Yirmisekiz sağlıklı kişide 3 haftalık zeytinyağı tüketimi sonucunda, lipid peroksidasyonu ürünlerinin DNA ile reaksiyonu sonucu meydana gelen Etheno-DNA hasarının miktarında önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir (Hillestorm ve diğ., 2006).

Literatürde zeytinyağının oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkisini gene özgü olarak inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.6. HeLa (SERVİKS ADENOKARSİNOMA) HÜCRELERİ

HeLa hücreleri olarak adlandırılan epiteliyal kökenli agresif serviks adenokarsinoma kanseri hücreleri, 1951'de Johns Hopkins Hastanesinde, 31 yaşındaki Henrietta Lacks isimli bir kadından rahim kanseri şüphesiyle alınan biyopsi örneğinin küçük bir

kısının George Gey tarafından hücre kültürü laboratuvarında kültüre alınmasıyla üretilmeye başlanmıştır (Shannon, 1972). HeLa hücreleri kültüre alınan ilk ölümsüz hücre hattı olup 50 yıldan fazla süredir kültür ortamında üretilmeye devam etmektedir. HeLa hücre kültürünün başlatıldığı 1951'den bu yana biyoloji, tıp, ilaç üretimi ve transplantasyon dahil birçok araştırma alanında model hücre olarak kullanılmıştır (Junji, 2006). Bu hücreler insan papilloma virüs 18 (HPV-18) dizileri içerir (Schwarz ve diğ., 1985) ve çok düşük oranda p53 gen anlatımı yapar (Scheffner ve diğ., 1991). Hücrelerin % 98'inde küçük telosentrik bir kromozom vardır. %100 anoploidi görülür. Tipik olarak 4 HeLa marker kromozomu olduğu belirlenmiştir (Macville ve diğ., 1999). Bunlar; bir kopya M1 kromozomu (3. kromozomun uzun kolu ile 1. kromozomun sentrozom ve uzun kolunun yeni bir düzenlemesidir), bir kopya M2 (3. kromozomun kısa kolu ile 5. kromozomun uzun kolunun bir kombinasyonudur), 4-5 kopya M3 (5. kromozomun kısa kolunun bir izokromozomudur) ve 2 kopya M4 (19. kromozomun bir kolu ile 11. kromozomun uzun kolu içerir) kromozomlarıdır.

HeLa kültürlerinde oksidatif DNA hasarı ve çeşitli oksidatif ajanlar ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. HeLa hücrelerine 20 saat boyunca normal besiyortamında 1-10 mM H₂O₂ ile uygulama yapıldıktan sonra farklı genlerde Southern emdirimi ile DNA hasarının belirlendiği bir çalışmanın sonuçları, oluşan hasarın rastgele gerçekleştiğini ve bölgeler arasında belirgin bir farklılık olmadığını göstermiştir (Burdon ve diğ., 1996). Çalışmalar H₂O₂'in ancak Fenton reaksiyonu ile OH[•]'e dönüşmesinin bir sonucu olarak DNA hasarı meydana getirdiğini (Jornot ve diğ., 1998) ve topoizomerez 1'in H₂O₂'in sitotoksitesinde önemli bir rolü olduğunu (Daroui ve diğ., 2004) ortaya koymuştur. Kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisin ve H₂O₂ uygulaması sonucu oluşan DNA zincir kırıklarının COMET analizi ile belirlendiği bir çalışma da, doksorubisin tarafından meydana getirilen kırıkların H₂O₂ tarafından meydana getirilen kırıklardan daha zor onarıldığı belirlenmiştir (Li ve diğ., 2004). Kuvvetli bir oksitleyici ajan olan 0.2 mM HOCl uygulamasının HeLa hücre canlılığını % 50 azalttığı ve 150 µM HOCl uygulamasının hücre içi ROT, MDA, protein karbonil ve 8-OH-dG düzeyini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (Park ve diğ., 2008).

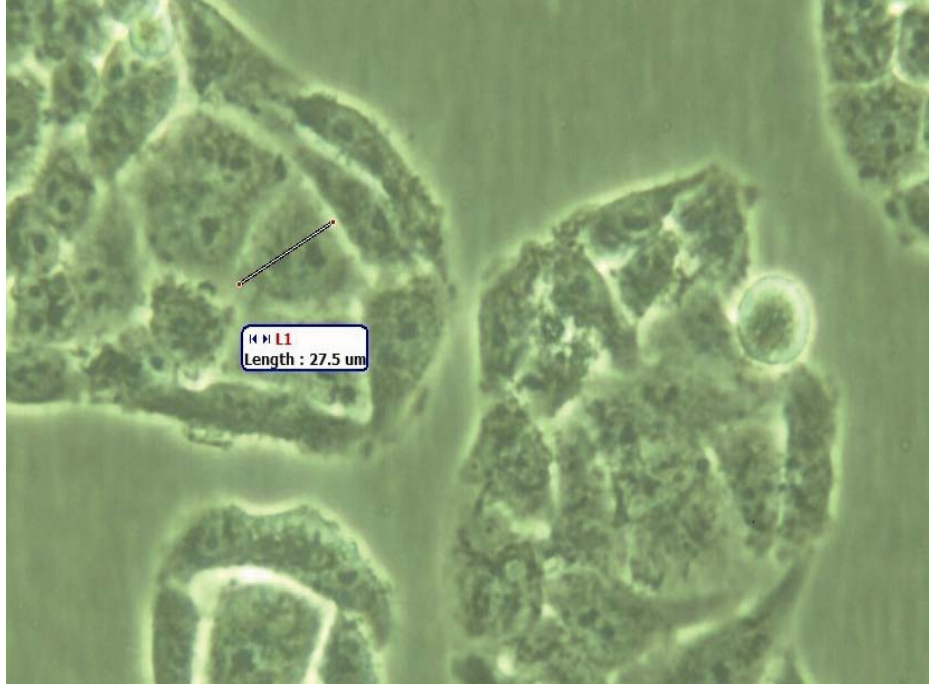
3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm analizler en az 3 tekrarlı olarak yapıldı.

3.1. HeLa HÜCRELERİNİN KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

Çalışmada materyal olarak kullanılan HeLa hücreleri (Şekil 3.1) İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü koleksiyonundan elde edildi. HeLa hücrelerine ait altkültürlerin yapılmasında sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı (Freshney, 2000):

1. 25 cm²'lik kültür kabı içindeki besiyeri [streptomisin (0,1 mg/ml), penisilin (100 ünite/ml), amfoterisin (0.25 µg/ml), % 10 fetal sığır serumu (FBS) içeren ve pH'sı 7.4 olan MEM (Minimum Essential Medium)] steril bir ortamda uzaklaştırıldı.
2. Kültür kabına hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından dikkatlice 5 ml (0.2 ml/cm²) PBS ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline") konuldu ve hücreler bu tamponla yıkandıktan sonra tampon döküldü. Kültür kabı içine, yine hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından, 1 ml tripsin/EDTA [%0.2 tripsin, %0.04 EDTA] eklendikten sonra enzimin tüm yüzeyi kaplaması sağlandı ve kültür kabı etüvde (Heraeus D-6450, Hanau) (37°C, % 5 CO₂) yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda kültür kabına 5 ml (0.2 ml/cm²) MEM eklenip pipetaj yardımıyla hücrelerin birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden tamamen ayrılarak süspansiyon haline gelmeleri sağlandı.
4. Yeni bir kültür kabında altkültürleme yapılmadan önce hücreler bir hemositometre yardımıyla sayıldı ve rutin bir altkültür için gerekli olan sayıda (10⁵ hücre/ml) hücre alınarak yeni kültür kabına aktarıldı. Hücreler % 5 CO₂ sağlayan etüvde, 37°C'da üretildi ve 3 günde bir altkültürleri yapıldı.



Şekil 3.1: HeLa hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altındaki görüntüsü. (Bu görüntü başlangıç hücre sayısı 10^5 hücre/ml olan 2 günlük kültürdeki hücrelere ait olup Olympus CK2 model mikroskopla alınmıştır.)

3.2. HeLa HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI

HeLa hücrelerinin çoğalma eğrisini çizmek ve jenerasyon süresini hesaplamak amacıyla, başlangıç sayısı 10^5 hücre/ml olan kültürlerde 10 gün boyunca her gün, kültürün başlatıldığı saatte hücre sayımı yapıldı. Hücreler 1:1 (v/v) tripan mavisi (% 0.5, PBS içinde hazırlandı) ile boyandı ve hemositometrede canlı hücre sayısı belirlendi (Freshney, 2000). Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek çizilen yarı logaritmik çoğalma eğrisi yardımıyla hücrelerin lag, log ve durağan evreleri belirlendi. Elde edilen çoğalma eğrisi kullanılarak jenerasyon sayısı ve süresi, Denklem 3.1 ve 3.2'ye göre hesaplandı (Moat, 1979):

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

n : Jenerasyon sayısı

N_2 : Logaritmik bölünme evresinin sonundaki hücre sayısı

N_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıcındaki hücre sayısı

$$St = (T_2 - T_1) / n \quad (\text{Denklem 3.2})$$

St : Jenerasyon süresi

T₂: Logaritmik bölünme evresinin bitiş zamanı

T₁: Logaritmik bölünme evresinin başlangıç zamanı

3.3. ZEYTİNYAĞI FENOLİK FRAKSİYONUNUN ELDE EDİLMESİ VE FENOLİK MADDE MİKTARININ BELİRLENMESİ

Ticari olarak satın alınmış olan zeytinyağından (doğal sızma, Marmara Birlik) zeytinyağı fenolik fraksiyonunun (ZFF) elde edilmesinde aşağıdaki prosedür izlendi (Nousis ve diğ, 2005):

1. 100 g (95 ml) zeytinyağı 30 ml metanol (MeOH, 414816, Carlo Erba) ile ayırma hunisinde iyice çalkalandı. Fazlar birbirinden ayrıldıktan sonra MeOH fazı (alt faz) ayrı bir kaba alındı. Ekstraksiyon işlemi 3 defa tekrarlandı ve MeOH fazları birleştirildi.
2. MeOH ekstresi 3 kez 150 ml hekzan (34859, Sigma Aldrich) ile ayırma hunisinde çalkalanarak hekzan fazına (üst faza) geçen yağ kalıntıları uzaklaştırıldı.
3. Ekstre vakumlu döner buharlaştırıcıda (RE100, Bibby Siterilin Ltd.) 40°C'da kuruluğa kadar buharlaştırıldı.
4. Ele geçen kuru ekstre ağırlığı belirlendikten sonra dimetil sülfoksit (DMSO, Merck K18788743) içinde çözündürüldü ve -20 °C'da saklandı.

MeOH ekstresinin total fenolik içeriğinin belirlenmesinde Ragazzi ve Veronose (1973) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Yöntem şu şekilde uygulandı; fenolik madde standardı olarak kullanılan gallik asit (GA) (Sigma G7384) stok çözeltisi 500 µg/ml derişimde hazırlandı ve 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15.62 µg/ml, 7.8 µg/ml, ve 3.9 µg/ml'lik seri sulandırılmaları yapıldı. Bir ml örnek veya standart üzerine 0.5 ml Folin belirteci (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Sigma F9252) eklendi. Bu karışıma 3 ml Na₂CO₃ (200 g/l) katılarak tüp karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Ardından 5.5 ml deiyonize su eklendi ve 1250 µg'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatantın 725 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrede (µQuant, Bio-Tek) ölçüldü.

3.4. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

Oksidatif stres oluşturmak amacıyla kullanılan H₂O₂, standart olarak kullanılan GA ve deney materyali olan ZFF'nun HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi Mosmann (1983) tarafından geliştirilen yöntemle belirlendi. Bu yöntem, kültürdeki canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesi ile MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium bromide; thiazolyl blue) molekülünün tetrazolium halkasının koparılması sonucu, suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesi ve bu kristallerin DMSO'da çözündürüldükten sonra 540 nm'de absorbans ölçümünün yapılması esasına dayanır.

Genel Prosedür

1. Her bir kuyucukta (200 µl) 10⁵ hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu petride başlatılmış olan kültürlerin üzerindeki 200 µl MEM atıldı ve sitotoksik etkisi araştırılan maddeyi içeren MEM/HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, H6136, Sigma) eklenerek % 5 CO₂ sağlayan etüvde, 37°C'da (uygulamaya göre uygun sürede) inkübasyona bırakıldı. Sadece MEM/ HBSS içeren negatif kontrol serisi de benzer şekilde hazırlandı.
2. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki MEM/ HBSS atıldı ve 200 µl PBS ile yıkama yapıldı.
3. Hücrelerin üzerine 5 mg/ml MTT (M5655, Sigma) çözeltisinden 30 µl ilave edilip 3 saat 37°C'lik etüvde inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi için hücrelerin üzerine 200 µl DMSO ilave edilip 30 dakika (160 devir/dakika) çalkalama yapıldı.
5. Oluşan renkli ürünün 540 nm dalga boyundaki absorbansı (650 nm referans dalga boyu olarak kullanılarak) ölçüldü ve ölçüm sonuçları Denklem 3.3 kullanılarak değerlendirildi.

$$\% \text{ Canlılık} = (A_D / A_K) \times 100 \quad (\text{Denklem 3.3})$$

A_K: Negatif kontrole ait absorbans

A_D: Deney grubuna ait absorbans

3.4.1. Zeytinyağı Fenolik Fraksiyonunun Sitotoksosite Analizi

HeLa hücrelerine uygulanacak ZFF derişimine ve süresine karar vermek için yürütülen analizlerde üç farklı süre (48, 24 ve 4 saat) ve 5 farklı derişim (0.0025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml) test edildi.

Yöntemde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. 10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu petride başlatılmış olan kültürün 24., 48. ve 68. saatinde (bkz. sf. 59) hücrelerin üzerindeki 200 µl MEM atıldı DMSO içinde çözüldürülmüş olan ZFF stoklarından en fazla % 0.125 DMSO içerecek şekilde MEM içinde 5 farklı derişimde (0.0025 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml) sulandırmaları yapıldı. Ayrıca DMSO'nun etkisini belirleyebilmek için % 0.125 DMSO içeren MEM de (kontrol) hazırlandı. Hazırlanan test materyallerinden hücrelerin üzerine 200 µl konularak belirlenen sürelerde etüvde (37°C, % 5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda genel prosedürün 2. basamağından itibaren analiz gerçekleştirildi.

3.4.2. Gallik Asitin Sitotoksosite Analizi

ZFF içinde yer alan maddelerden biri olan gallik asit ile yürütülen referans çalışmalarında hücrelere uygulanacak GA derişimine ve süresine karar vermek için yürütülen analizlerde üç farklı süre (48, 24 ve 4 saat) (Şekil 3.2) ve 6 farklı derişim (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml ve 0.1 mg/ml) test edildi. Yöntemde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. 10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu petride başlatılmış olan kültürün 24., 48. ve 68. saatinde hücrelerin üzerindeki 200 µl MEM atıldı DMSO içinde çözüldürülmüş olan ZFF stoklarından en fazla % 0.125 DMSO içerecek şekilde MEM içinde 5 farklı derişimde (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.025 mg/ml, 0.05 mg/ml ve 0.1 mg/ml) sulandırmaları yapıldı. Ayrıca DMSO'nun etkisini belirleyebilmek için % 0.125 DMSO içeren MEM de (kontrol) hazırlandı. Hazırlanan test materyallerinden hücrelerin üzerine 200 µl konularak belirlenen sürelerde etüvde (37°C, % 5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda genel prosedürün 2. basamağından itibaren analiz gerçekleştirildi.

3.4.3 Hidrojen Peroksitin Sitotoksite Analizi

Oksidatif stres oluşturmak üzere kullanılacak H₂O₂ derişiminin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizde, kültürlerin başlangıcından itibaren toplam 72 saatlik inkübasyon (37°C, % 5 CO₂) süresinin son 10, 30 ve 60 dakikası boyunca hücrelere H₂O₂ uygulaması yapıldı. Her kullanımdan önce stok H₂O₂'in (K28926297, Merck) 240 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülerek, Denklem 3.3 yardımıyla derişimi hesaplandı (Barbouti ve diğ., 2002).

$$K_{H_2O_2} = (A_{240} / 43.6) \times Sf \quad (\text{Denklem 3.4})$$

$K_{H_2O_2}$: H₂O₂ derişimi

A_{240} : 240 nm dalga boyundaki absorbans değeri

Sf: Sulandırım faktörü

Daha sonra stok H₂O₂ HBSS içinde 5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.05 mM ve 0.005 mM derişimlere seyreltilerek hücrelerin (3×10^6 hücre/ml) üzerine (200 µl/kuyucuk) ilave edildi. Ayrıca sadece HBSS eklenen bir grup da (negatif kontrol) oluşturuldu. İnkübasyon süresinin (10, 30 veya 60 dakika) sonunda genel prosedürün 2. basamağından itibaren aynı işlemler yapıldı.

3.4.3.1. Besiyerinde Kalan H₂O₂ Derişiminin Belirlenmesi

Kültür ortamına eklenen oksidatif stres ajanı H₂O₂'in hücre içine alınma miktarını ve bu alınımlar üzerine ZFF ve GA'in bir etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere besiyerinde kalan H₂O₂ derişimi "fenol kırmızısı yöntemi" ile belirlendi (Pick ve Keisari, 1980; Liu ve Sun, 2003). Bu yöntem; yaban turbu peroksidazı (HRP) varlığında, H₂O₂ bağımlı bir reaksiyonla fenol kırmızısının (fenolsülfonfitalin) okside olması sonucu reaksiyon karışımının mor renk alması esasına dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Yöntemde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. HeLa hücre kültürleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında, 10^5 hücre/ml (200 µl) olacak şekilde başlatıldı.
2. Kültürün 24. veya 68. saatinde hücrelerin üzerindeki besiyerleri, ZFF (95 µg/ml) veya GA (28 µg/ml) içeren taze besiyerleri ile değiştirildi.

3. Kültürün 72. saatinde besiyerleri atılarak hücreler 200 µl PBS ile yıkandı ve fenol kırmızısı içermeyen modifiye HBSS (Sigma H6648) ile sulandırımı yapılan 50 ve 100 µM H₂O₂ (200 µl) ile normal kültür şartlarında 1 saat inkübe edildi. Kültür kabının hücresiz bir kuyucuğuna da aynı derişimlerde H₂O₂ eklendi ve H₂O₂'in hücresiz ortamdaki durumu değerlendirildi.
4. Besiyerinde H₂O₂ derişiminin zamana bağılı değişimini belirlemek için, inkübasyonun 10. , 30. ve 60. dakikasında kuyucuklardaki HBSS örneklerinden 100 µl alındı ve 200 µl fenol kırmızısı çözeltisi [40 mM NaCl, 0.1 g/l fenol kırmızısı (1.07241.0005, Merck), 8.5 U/ml HRP (1.16216.0001, Merck), 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0)] üzerine tüp karıştırıcıda karıştırılarak eklendi ve 37°C'da 5 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda karışıma 2 µl 1 N NaOH eklendi ve oluşan mor renkli kompleksin 610 nm dalga boyundaki absorbansı çok kuyucuklu okuyucuda (µQuant, BioTek) ölçüldü. H₂O₂ içermeyen HBSS ile yapılan ölçümden elde edilen değer kör olarak kullanıldı.

Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen H₂O₂ miktarlarının belirlenmesinde; HBSS içinde 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µM derişimde hazırlanmış H₂O₂ standartlarının 610 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile oluşturulan standart grafik ve doğru denklemden yararlanıldı.

3.5. HÜCRE İÇİ ROT DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Hücre içi ROT düzeyleri, 2',7'-diklorofloresin diasetatın (DCFDA) hücre içi oksidasyonu sonucu oluşan fluoresan ürünün ölçümü temeline dayanan yöntemle belirlendi (Negre-Salvayre ve diğ., 2002). Bu yöntemde DCFDA hücre içine alındıktan sonra esteraazlar tarafından kesime uğratarak DCFDA'nın indirgenmiş formuna (DCFH) dönüşür. DCFH ise, hücre içindeki ROT tarafından DCF'e oksitlendikten sonra yaydığı fluoresans ile [eksitasyon (485 nm) ve emisyon (530 nm)], hücre içi ROT miktarının bağıl olarak belirlenmesine olanak sağlar.

Yöntem şu şekilde uygulandı:

1. HeLa hücre kültürleri floresans ölçümü için uygun 96 kuyucuklu kültür kaplarında, 10^5 hücre/ml (200 μ l) olacak şekilde başlatıldı.
2. Kültürün 24., 48. veya 68. saatinde hücrelerin üzerindeki besiyerleri ZFF (95 μ g/ml) veya GA (28 μ g/ml) içeren taze besiyerleri ile değiştirildi.
3. Kültürün 72. saatinde besiyerleri atılarak hücreler PBS ile yıkandı. Deney grubuna ait hücreler HBSS ile sulandırımı yapılan 200 μ M H_2O_2 ile, kontrol grubuna ait hücreler ise sadece HBSS ile 1 saat boyunca etüvde 37 °C’da inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki üst sıvılar atılarak PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen modifiye HBSS içinde taze olarak hazırlanıp 37 °C’da ön ısıtma yapılan 5 μ M DCFDA (Sigma, D6883) çözeltisinden 200 μ l eklenerek 15 dakika etüvde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda fluorometrede (FLx800, Bio-Tek) 485 nm (eksitasyon) ve 530 nm (emiyon) dalga boylarında 10 dakika arayla 6 kez (0., 10., 20., 30., 40. ve 50. dak) floresans ölçüm yapıldı.
6. Elde edilen floresans değerlerinin (rfu/min; bağıl floresans birimi/dakika) normalize edilmesi amacıyla Thoma lamında sayım yapılarak, her bir kuyucuktaki hücre sayısı belirlendi. Eşit sayıda hücrenin yaptığı floresans değerleri hesaplanarak bağıl hücre içi ROT miktarları Denklem 3.5 kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Bağıl hücre içi ROT miktarı (\% Kontrol)} = (F_d / F_k) \times 100 \quad (\text{Denklem 3.5})$$

F_d : Deney grubuna ait floresans miktarı.

F_k : Kontrol grubuna ait floresans miktarı.

3.6. DNA HASARININ BELİRLENMESİ

DNA hasarlarının gene özgü olarak belirlenmesinde oldukça hızlı ve duyarlı bir teknik olan Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Quantitative Polymerase Chain Reaction”, QPCR) tekniği kullanıldı (Wang ve diğ., 2003; Ayala-Torres ve diğ., 2000; Sawyer ve van Houten, 1999).

Bu tekniğin uygulandığı HeLa hücrelerine, deney öncesinde uygulanan test materyallerinin dozları ve uygulama süreleri Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. DNA izolasyonu öncesinde HeLa hücrelerine yapılan uygulamalar.

Gallik Asit		ZFF		H ₂ O ₂	
Doz (µg/ml)	Ön uygulama Süresi (saat)	Doz (µg/ml)	Ön uygulama Süresi (saat)	Doz (µM)	Uygulama Süresi (saat)
28	4	95	4	0 750	1

Yöntemin uygulanmasından önce hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı; ardından QPCR analizi için ilk kez bu çalışmada kullanılacak 3 farklı bölge ile 2 internal kontrole ait bölgelerin PCR optimizasyonları gerçekleştirildi.

3.6.1. DNA İzolasyonu

QPCR analizinde kullanılacak DNA örneklerinin izolasyonunda Kalinovski ve diğ. (1992) tarafından önerilen DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek kullanıldı.

Yöntemde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Hücrelerin üzerindeki HBSS uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı.
2. 150 µl tripsin-EDTA eklenerek 15 dakika etüvde (37°C, % 5 CO₂) inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda kuyucuklara tripsin enzimini inaktive etmek için 5 ml MEM eklendi ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktararak 10°C'da 3000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkanarak tekrar 10°C'da 3000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
5. Pellet üzerine 1.5 ml lizis tamponu [0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, % 2 SDS] eklenip süspansiyon edildi ve 200 µg/ml proteinaz K konularak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda lizata eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1 v/v/v) eklendi ve 16 000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA organik (üst) faza çekildi.
7. Üst faz yeni bir tüpe alındı ve üst faz ile 6. basamak bir kez daha tekrarlandı.
8. Üst faz tekrar yeni tüpe aktarıldı ve 15 µg/ml RNaz eklenerek 37°C'da 1 saat inkübe edildi

9. İnkübasyon sonunda eşit hacimde kloroform: izoamil alkol (24:1 v/v) ile nazıkçe karıştırılıp 16000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 3 M NaAc (sodyum asetat) (pH 5.2) çözeltisinden 1:10 (v:v) oranında eklendi ve nazıkçe karıştırıldı.
11. Elde edilen karışım hacminin 2 katı %100 izopropanol ile karıştırıldı ve DNA çökene kadar nazıkçe alt-üst edildi.
12. Tüp içinde ipliksi bir görünümde çöken DNA bir pipet ucu ile yeni bir mikrotüpe aktarıldı, 1 ml %70 (v/v) EtOH (etil alkol) ile yıkandı ve oda sıcaklığında alkolün uçması için 5-10 dakika bekletildi.
13. DNA 400 µl steril ultra saf H₂O'da 37°C'da çözündürüldü ve -20°C'da saklandı. İzole edilen DNA'ların kalitesi yatay agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra miktarları fluorometrik olarak "Quant-iT™ dsDNA Analiz Kiti" (Q32850, Invitrogen) ile belirlendi.

3.6.2. QPCR Primerlerinin Tasarımı

BER onarım sisteminde kilit rol oynayan bu enzimi şifreleyen APEX gen bölgesi içinden 2082 nükleotidlik bir bölge, HeLa hücrelerinde transkripsiyonel olarak aktif bir bölge (Kane ve Linn, 1981; Fan ve diğ., 2003) olarak QPCR analizinde kullanılmak üzere belirlendi. APEX genine ait 2637 bazlık diziden 2082 baz çifti (bç) ürün (APEX-U) elde etmek için aşağıda baz dizisi verilen primer çifti Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nin (National Center for Biotechnology Information, NCBI) Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlandı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tool/primer-blast/>). Ayrıca internal kontrol olarak kullanılmak üzere 180 bç ürün (APEX-K) elde etmek için başka bir primer çifti de aynı program ile tasarlandı.

2082 bç'lik ürüne ait primer çifti

Primer I: 5'-ATAACGTGGTTTGAAAGGCG-3'

Primer II: 5'-AATGGTAGTTGAGGGGGCTT-3'

180 bç'lik ürüne ait primer çifti

Primer I: 5'-CCCCAGATCAGAAAACCTCA-3'

Primer II: 5'-AACGGAGAAAAGGGGTGACT-3'

HeLa hücrelerinde transkripsiyonel olarak inaktif bir bölgeye ait hasarın belirlenmesi amacıyla β -globin gen kümesinden 2334 bç ürün (BETA) elde etmek için aşağıda baz dizisi verilen primer çifti NCBI'ın Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlandı.

Primer I: 5'-TTGCTGCAATTGCTTTTCAC-3'

Primer II: 5'- GCACGTTCTTAGGAGTTGGACT-3'

16569 nükleotid uzunluğundaki mtDNA'nın 5981-8213 bç arasındaki COX I, tRNA-serin, tRNA-asparajin ve COX II'ye ait genleri içeren bölgeden 2232 bç ürün (COX-U) elde etmek için tasarlanan primer çifti aşağıda görülmektedir.

Primer I: 5'-TGGAGTCCTAGGCACAGCTC-3'

Primer II: 5'-GATGGGCATGAAACTGTGGT-3'

Ayrıca mtDNA'nın çoğaltımında internal kontrol olarak kullanılmak üzere 161 bç ürün (COX-K) elde etmek için tasarlanan primer çifti de aşağıda görülmektedir:

Primer I: 5'-ATCGCCCTTACCACGCTAC-3'

Primer II: 5'-GTTGATGCAGAGTGGGGTTT-3'

3.6.3. QPCR Analizi

3.6.3.1. QPCR Optimizasyonu

Nükleer ve mtDNA'da QPCR analizini gerçekleştirmek için dizayn edilen primer çiftleri ile tek ve istenilen boyutta ürün elde etmek için $MgCl_2$ derişimi, primer çiftlerinin derişimi, Taq DNA polimeraz miktarı, dNTP derişimi, kalıp miktarı ve primerlerin bağlanma sıcaklıklarında değişiklikler yapılarak PCR optimizasyonları gerçekleştirildi (TC-3000, Techne[®]) (Tablo 3.2). Optimizasyon amacıyla gerçekleştirilen PCR'larda ürünlerin kaliteleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

QPCR analizinde doğru döngü sayısı seçilmesi çok önemlidir (Yakes ve Van Houten, 1997). Bunun için nDNA'daki bölgeler için 20-30 döngülük, mtDNA'daki bölgeler için 10-20 döngülük reaksiyonlar yapılarak absise PCR ürün miktarları, ordinata döngü sayıları konularak çizilen grafiklerden döngü sayısına bağlı olarak ürün miktarının üssel

değişim gösterip göstermediği kontrol edildi. Grafiklerde her bir bölge için ürün miktarının kolay ve başarılı bir şekilde ölçülebileceği ekponansiyal artışın olduğu döngülerden biri seçildi (Yakes ve van Houten, 1997). Belirlenen döngü sayısında PCR ürün miktarının kalıp miktarı ile doğru orantılı olarak değiştiğini görmek ve uygun kalıp derişimine karar vermek için 50µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA içeren PCR'lar 3 tekrarlı olarak yapıldı. Gerçekleştirilen tüm optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen uygun değerlerdeki bileşen derişimleri ve miktarları Tablo 3.3'te reaksiyon koşulları ise Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6'da verildi.

Tablo 3.2: Optimizasyon çalışmaları sırasında denenen PCR bileşenlerinin derişim ve miktarları.

PCR Bileşeni	PCR Bölgesi				
	COX-U	COX-K	APEX-U	APEX-K	BETA
dNTP karışımı (µM)	200-300	200-300	200-300	200-300	200-300
MgCl ₂ (mM)	1, 1.5, 2	1.25, 2, 3.5, 4	1.5, 2, 3, 4	1, 1.5, 2, 2.5	1.5, 2, 3, 4
Primer I (µM)	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4
Primer II (µM)	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4	0.25, 0.3, 0.4
Kalıp DNA (ng/ 50 µl)	100, 250, 300	100, 250, 300	100, 250, 300	100, 250, 300	100, 250, 300
Taq DNA Polimeraz (U)	1.25, 2, 3	1.25, 2, 3	1.25, 2, 3	1.25, 2, 3	1.25, 2, 3
Bağlanma Sıcaklığı (°C)	57, 58, 59, 60, 61, 62, 63	56, 57, 58, 59, 60	56, 57, 58, 59, 60	57, 58, 59	55, 56, 57, 58, 59, 60

Tablo 3.3: QPCR'da kullanılan bileşenlerin; marka, kod ve son derişimleri.

PCR Bileşenleri	Marka, Kod no.	PCR Bileşenlerinin Son Derişimi/ Miktarı				
		COX-U	COX-K	APEX-U	APEX-K	BETA
H ₂ O	-	-	-	-	-	-
10x PCR tamponu	Fermentas, EP402	1x	1x	1x	1x	1x
dNTP karışımı (µM)	Fermentas, R0241	200	200	200	200	200
MgCl ₂ (mM)	Fermentas, EP402	1.25	2.5	2	1	2
Primer I (µM)	IDT, -	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer II (µM)	IDT, -	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Kalıp DNA (ng)	-	100	100	100	100	100
Taq DNA Polimeraz (U)	Fermentas, EP402	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Reaksiyon Hacmi (µl)	-	50	50	50	50	50

Tablo 3.4: APEX geninde 2082 ve 180 bç'lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.

	APEX-U (2082 bç)		APEX-K (180 bç)	
	Sıcaklık, Süre (dakika)	Döngü sayısı	Sıcaklık, Süre (dakika)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94°C, 3	1	94°C, 3	1
Denatürasyon	94°C, 0.5		94°C, 0.5	
Bağlanma	58°C, 1	27	57°C, 1	25
Uzama	72°C, 2		72°C, 0.5	
Son Uzama	72°C, 10	1	72°C, 10	1

Tablo 3.5: β globin gen kümesinde 2334 bç'lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.

	BETA (2334 bç)	
	Sıcaklık, Süre (dakika)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94°C, 3	1
Denatürasyon	94°C, 0.5	
Bağlanma	58°C, 1	27
Uzama	72°C, 2	
Son Uzama	72°C, 10	1

Tablo 3.6: mtDNA'dan 2232 ve 161 bç'lik bölgenin çoğaltılmasında kullanılan QPCR koşulları.

	COX-U (2232bç)		COX-K (161 bç)	
	Sıcaklık, Süre (dakika)	Döngü sayısı	Sıcaklık, Süre (dakika)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94°C, 3	1	94°C, 3	1
Denatürasyon	94°C, 0.5		94°C, 0.5	
Bağlanma	59°C, 1	16	57°C, 1	18
Uzama	72°C, 2		72°C, 0.5	
Son Uzama	72°C, 10	1	72°C, 10	1

3.6.3.2. QPCR Ürün Miktarlarının ve DNA Hasar Frekanslarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA'lar kullanılarak 3 tekrarlı olarak yapılan QPCR'lar sonucu oluşan ürünlerin miktarı fluorometrik olarak "Quant-iT™ dsDNA Analiz Kiti" (Q32850, Invitrogen) ile belirlendi (Kovalenko ve Santos, 2009). Daha sonra hasar frekansını belirlemek istediğimiz dizilerin PCR ürünlerinin miktarları internal kontrollere ait PCR

ürünlerinin miktarlarına göre normalize edildi. Üründeki lineer azalmayı görmek ve reaksiyonun işleyişini kontrol etmek için (Yakes ve van Houten, 1997) her bir reaksiyonda bütün kalıplar için DNA'ların normale göre yarısının (50 ng) kalıp olarak kullanıldığı bir reaksiyon da gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin bağıl miktarının belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{PCR ürünlerinin bağıl miktarı (\%)} = (D_d / D_k) \times 100 \quad (\text{Denklem 3.6})$$

D_d : Dene grubuna ait DNA ile elde edilen PCR ürününün miktarı.

D_k : Kontrol grubuna ait DNA ile elde edilen PCR ürününün miktarı.

Elde edilen PCR ürünlerinin bağıl miktarı; *Poisson* denklemi olarak adlandırılan ve büyük örneklerde düşük frekanslarda meydana gelen olayların sıklığını belirlemek için kullanılan aşağıdaki denklemde yerine konularak hedef dizilerdeki hasar frekansı (λ) hesaplandı (Ayala-Tores ve diğ., 2000).

$$\lambda = - \ln (A_d / A_k) \quad (\text{Denklem 3.7})$$

A_d : Dene grubuna ait bağıl ürün miktarı

A_k : Kontrol grubuna ait bağıl ürün miktarı.

Tüm dizilerin karşılaştırılabilmesi için elde edilen hasar frekansları Denklem 3.8, 3.9 ve 3.10 kullanılarak 10 kb'lık dizilerdeki hasar frekanslarına dönüştürüldü.

$$\text{APEX-U için Hasar Frekansı /10 kb} = (10000 \times \text{Hasar Frekansı}) / 2082 \quad (\text{Denklem 3.8})$$

$$\text{BETA için Hasar Frekansı /10 kb} = (10000 \times \text{Hasar Frekansı}) / 2334 \quad (\text{Denklem 3.9})$$

$$\text{COX-U için Hasar Frekansı /10 kb} = (10000 \times \text{Hasar Frekansı}) / 2232 \quad (\text{Denklem 3.10})$$

3.6.4. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen DNA'ların ve optimize PCR ürünlerinin kalite kontrolleri %1'ik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Yürütme tamponu olarak 1x tris-asetat (TAE) tamponu kullanıldı (Tablo 3.7). İşlem, Maniatis ve diğ., (1982)'nin önerdiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yürütme tampon çözeltisinin içeriği.

Yürütme Tamponu (5 x/ 1 L, TAE tamponu, pH 8.0)	Miktar	Marka, Kod No.
Tris-base	242 g	Sigma, T8524
Glasiyel asetik asit	57,1 ml	Sigma, A9967
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml	Sigma, E5134

0.4 g agaroz (Bioron, SIG045K0014) 40 ml 1x TAE tampon çözeltisi içinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 50-60°C'a kadar soğutuldu. Daha sonra üzerine 4 µl EtBr (5 mg/ml) ilave edilerek homojen hale getirildi. Jel karışımı, tarak yerleştirilerek hazırlanmış yatay jel kasetine (6x 9 cm) (Minicell[®] Primo[™] EC320, Thermo) dökülerek polimerize olması beklendi.

Polimerize olan jel, yürütme tamponunun bulunduğu tanka alındı ve 14 µl PCR ürünü veya eşit miktarda DNA örneği, uygun miktarda 6x yükleme tamponu çözeltisi (Fermentas, R0611) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 70 V sabit voltajda, 45 dakika süresince gerçekleştirildi.

3.7. ENZİMATİK ANALİZLER

3.7.1. Kaspaz 9 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarının tetiklediği apoptotik hücre ölümü ile ZFF ve GA'in bu süreçteki rolünü belirlemek amacıyla hücre içi yolağın başlatıcı kaspazı olan kaspaz 9 enziminin aktivitesi "Kaspaz-9 fluorometrik aktivite analiz kiti" ["Caspase 9 Fluorometric Activity Assay Kit, LEHD", Chemicon (Millipore)] kullanılarak belirlendi. Bu analiz, substrat olarak kullanılan LEHD-AFC'nin (7-amino-4-triflorometil kumarin) kaspaz 9 enzimi tarafından kesilmesi sonucu oluşan ürünün fluorometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. LEHD-AFC 400 nm'de maksimum floresans yayarken kaspaz 9 kesimi sonucu oluşan ürün (serbest AFC) 505 nm'de floresans yayar. Enzim aktivitesi sonucunda reaksiyon karışımının floresan özelliğindeki bu değişim fluorometrede 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon filtresi kullanılarak enzim aktivitesinin belirlenmesine olanak sağlar. Kaspaz 9 enzim aktivitesini bu kit ile belirlemek üzere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 25 cm²'lik kültür kaplarında 10⁵ hücre/ml (8 ml) olacak şekilde başlatılmış olan kültürlerle inkübasyonun son 4 saati boyunca 95 µg/ml ZFF, 28 µg/ml GA veya sadece MEM (kontrol) ile uygulama yapıldı.
2. Uygulama sonunda hücrelere 750 µM H₂O₂ ile 1 saat uygulama yapıldı ve daha sonra taze besiyeri eklenerek 5, 15, 23 ve 47 saat normal kültür şartlarında (%5 CO₂, 37°C) inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki MEM 15 ml'lik tüplere alındı.
4. Kültür kabına hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından dikkatlice 5 ml PBS aktarıldı ve hücreler yıkandıktan sonra tampon döküldü. Kültür kabı içine 1 ml tripsin/EDTA eklendikten sonra enzimin tüm yüzeyi kaplaması sağlandı ve kültür kabı etüvde 37°C'da yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda kültür kabına 5 ml MEM eklenip hücreler süspansiyon edildi ve bu süspansiyon 3. adımda 15 ml'lik tüplere alınan MEM üzerine aktarılarak +4°C'da 3000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldıktan sonra MEM'in tamamen uzaklaştırılması için hücre pelleti 2 ml PBS ile süspansiyon edilerek +4°C'da 3000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 100 µl soğuk lizis tamponunda süspansiyon edildi ve içine buz atılarak soğutulmuş ultrasonik su banyosunda 15 sn sonikasyon 10 sn buz üstünde bekletilerek 15 dakika parçalama yapıldı.
8. Hücrelerin parçalanmış olduğu mikroskobik olarak kontrol edildikten sonra 50 µl hücre lizatına 2x reaksiyon tamponu (50 µl) ve 1 mM LEHD-AFC substratı (5 µl) eklendi ve 37 °C'da 1.5 saat inkübe edildi. Hücre lizatının geri kalan kısmı protein miktar tayininde kullanılmak üzere -80°C'da saklandı.
9. İnkübasyon sonunda örneklerin floresans (rfu/min) miktarları çok kuyucuklu fluorometrik okuyucuda (FLx800, Bio-Tek) 400/505 nm'de (eksitasyon/ emisyon) ölçüm yapılarak belirlendi.
10. Elde edilen floresans değerleri örneklerin protein derişimlerine göre normalize edildi ve bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi Denklem 3.11 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kaspaz 9 aktivitesi (\% Kontrol)} = (F_D / F_K) \times 100 \quad (\text{Denklem 3.11})$$

F_D = Deney grubuna ait floresans miktarı

F_K = Kontrol grubuna ait floresans miktarı

3.7.2. Sitokrom c Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Mitokondride elektron taşıma sisteminde IV. kompleks olarak işlev gören sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi oksidatif stres ile mitokondriyal fonksiyon arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla belirlenmiştir. Sitokrom oksidaz enzim aktivitesi kolorimetrik bir yöntem ile “Sitokrom c Oksidaz Analiz Kiti” (“Cytochrome c Oxidase Assay Kit”, Sigma) kullanılarak belirlendi. Bu yöntem; Sitokrom oksidaz tarafından ferrositokrom c'nin ferrisitokrom c'ye oksitlenmesi ve sonuçta oluşan ürün nedeniyle 550 nm'deki absorbansın azalması temeline dayanır (“Cytochrome c Oxidase Assay Kit Technical Bulletin”, Sigma). Sitokrom oksidaz enzim aktivitesini, bu kit ile belirlemek üzere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. 25 cm²'lik kültür kaplarında 10⁵ hücre/ml (8 ml) olacak şekilde başlatılmış olan kültürlerdeki hücelere ZFF (95 µg/ml), GA (28 µg/ml) ve/veya 750 µM H₂O₂ uygulaması yapıldıktan sonra 8 ml taze besiyeri eklenerek 5 saat 37°C'de etüvde inkübe edildi.
2. Hücrelerin üzerindeki MEM/HBSS atıldıktan sonra 5 ml PBS ile yıkama yapıp 1 ml tripsin/EDTA eklenerek enzimin tüm yüzeyi kaplaması sağlandı ve kültür kabı etüvde 37°C'da yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda kültür kabına 5 ml MEM eklenip hücreler süspansiyon edildi ve hücre süspansiyonu tüpe aktarıldı ve +4°C'da 3000 xg'de 10 dakika santrifüjlendi.
4. Süpernatant atıldıktan sonra MEM'in tamamen uzaklaştırılması için hücre pelleti kit içeriğindeki izolasyon tamponu I (250 mM sukroz, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, pH 7.4) (5 ml) ile süspansiyon edilerek santrifüj tekrarlandı.
5. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti 1 ml izolasyon tamponu I ile süspansiyon edildi ve içerisine buz eklenerek soğutulmuş ultrasonik su banyosunda 10 sn sonikasyon 15 sn buz üstünde bekletilerek 15 dakika parçalama yapıldı.
6. Hücre lizatı +4°C'da 10000 xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. Pellet, kit içeriğindeki izolasyon tamponu II (0.1 M KCl, 50 mM Tris HCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, %1 BSA, pH 7.5) (1 ml) ile süspansiyon edildi ve 0°C'da 7000 xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Pellet (mitokondriler) 0.25 M sukroz çözeltisi (100 µl) içinde süspansiyon edildi.
8. Kuvartz küvet içine alınan 80µl mit okondri süspansiyonu 950 µl analiz tamponu (120 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 7.0) ve 50 µl enzim analiz tamponu (250 mM

sukroz, 10mM Tris HCl, pH 7.0) ile karıştırıldı. Reaksiyon, 50 µl ferrositokrom c eklenerek başlatıldı ve 550 nm'deki absorbans değişimi ($\Delta A/\text{dakika}$) spektrofotometrede, ekleme yapıldıktan 5. saniye sonra başlanarak 1 dakika boyunca (10 sn arayla 7 defa) kinetik okuma yapılarak belirlendi. Sitokrom oksidaz enzim aktivitesi Denklem 3.12 kullanılarak hesaplandı [ünite; 25°C'da pH 7.0'de dakikada 1 µM ferrositokrom c'yi oksitleyen enzim miktarını tanımlar ("Cytochrome c Oxidase Assay Kit Technical Bulletin", Sigma)]. Mitokondri süspansiyonunun 20 µl'si protein miktarının belirlenerek normalizasyon yapılabilmesi için -80°C'da saklandı.

$$\text{Ünite/ml} = \frac{(\Delta A / \text{dakika}) \times \text{Toplam reaksiyon hacmi (1.1 ml)}}{[\text{Örnek hacmi (0.08 ml)} \times 21.84]} \quad (\text{Denklem 3.12})$$

3.7.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Kaspaz 9 ve sitokrom oksidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde protein derişimindeki farklılıkların giderilmesi ve normalizasyon yapılabilmesi için örneklerin protein derişimleri bişinkoninik asit (bicinchoninic acid, BCA) yöntemine göre (Smith ve diğ., 1985), BCATM protein analiz kiti ("BCATM Protein Assay Kit", Pierce Biotechnology) kullanılarak belirlendi. Önce 96 kuyucuklu kabın kuyucuklarına 200 µl çalışma solüsyonu [tampon A: tampon B, 50:1] ve üzerine standart olarak kullanılacak farklı derişimlerdeki BSA çözeltileri veya örneklerden 25 µl eklenerek pipetajla homojenize edildi ve 37°C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kap oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi ve 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirildi. BSA standartlarına ait absorbans değerleri standart grafiğin çizilmesinde, bu grafikten elde edilen denklem ise örneklerin protein derişimlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

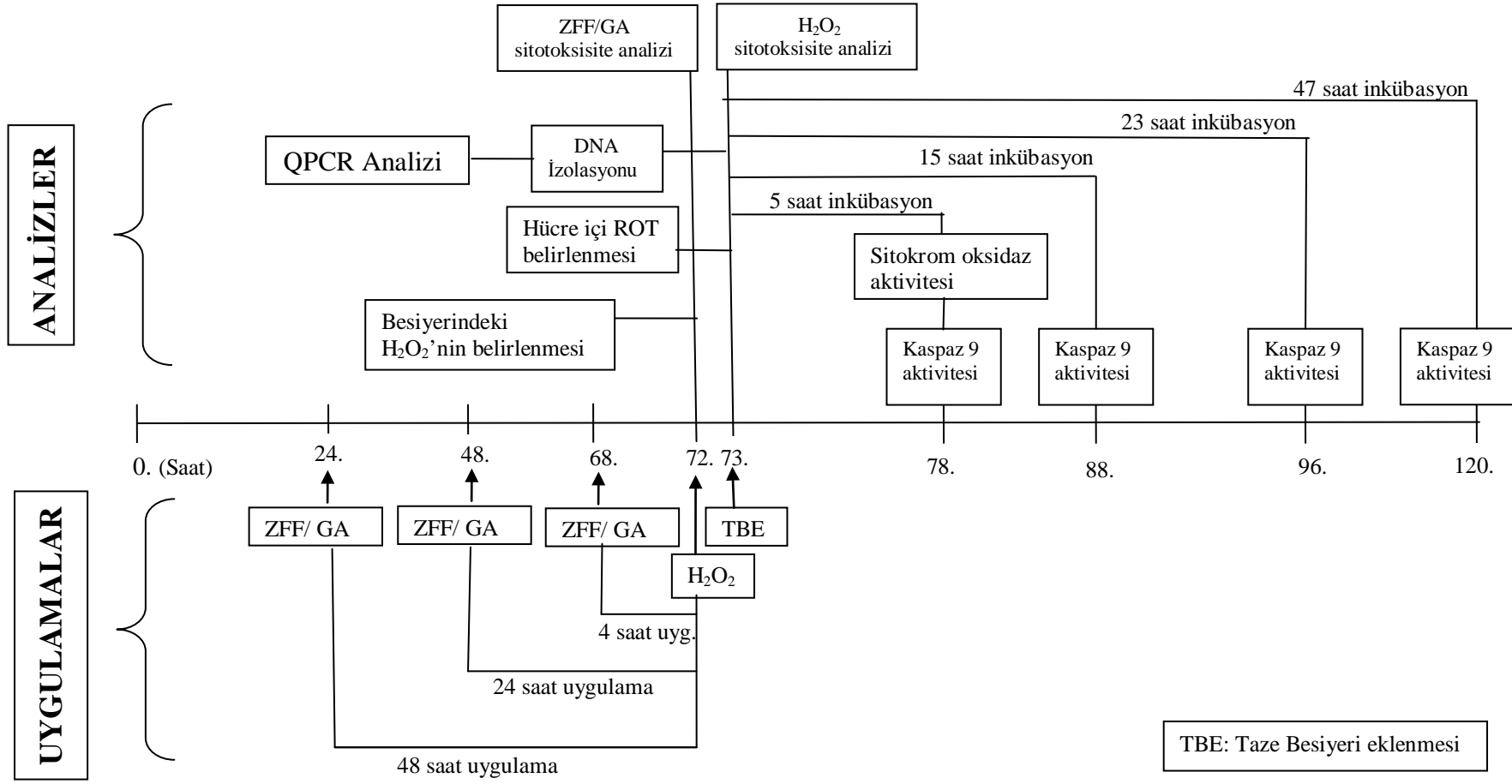
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Deneylere ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar (X) ve standart sapmalar (SD) hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve ikincil test olarak Dunnet testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$

olarak kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism 4.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

3.9. TOPLU DENEY ÇİZELGESİ

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm uygulamalar, analizler ve saatleri Şekil 3.2’de özetlenmiştir.

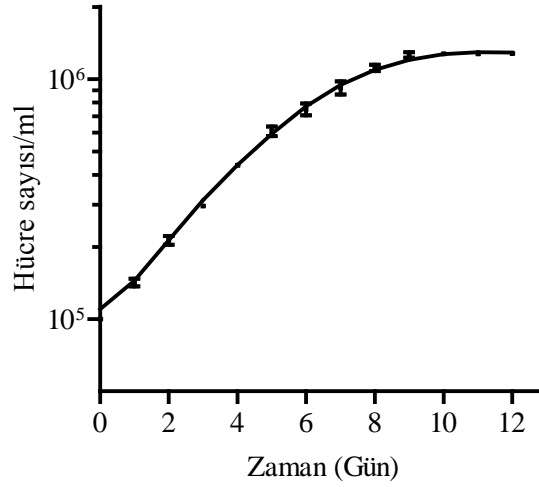


Şekil 3.2: Deneysel çalışmaların şematik gösterimi.

4. BULGULAR

4.1. HeLa HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİSİ

HeLa hücrelerine ait çoğalma eğrisi Şekil 4.1'de görülmektedir. Başlangıçtaki hücre sayısı 10^5 hücre/ml olan kültürlerin günlük hücre sayısı değişimlerinin ölçülmesi sonucunda elde edilen grafiğe göre, hücrelerin logaritmik faza 1. gün, durağan faza ise 7. gün girdikleri saptandı. Elde edilen grafik yardımıyla HeLa hücrelerinin jenerasyon süresinin 2 gün olduğu hesaplandı. Bu sonuçlara göre madde uygulamalarının hücrelerin kültüre alınmalarından sonraki 24. saatte; adaptasyon ve tutunmalarının gerçekleşmesinden sonra yapılmasına karar verildi.

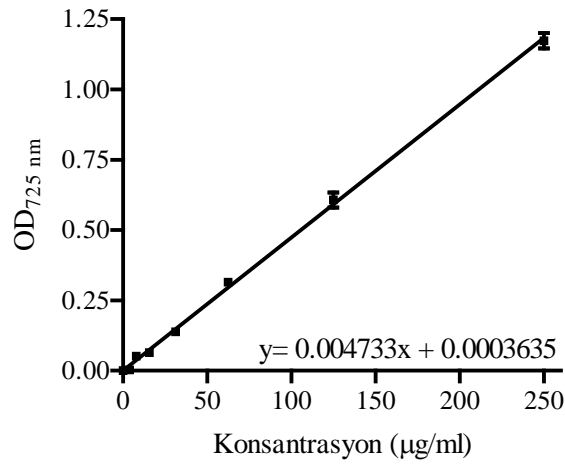


Şekil 4.1: HeLa hücrelerinin yarı-logaritmik çoğalma eğrisi ($R^2= 0.99$)

4.2. ZEYTİNYAĞI FENOLİK FRAKSİYONUNDAKİ FENOLİK MADDE MİKTARI

Nousis ve diğ. (2005) tarafından önerilen yöntemle göre 100 g (95 ml) zeytinyağından yapılan fenolik ekstraksiyon sonucunda 362.2 ± 4.8 mg kuru madde elde edildi.

Elde edilen fenolik fraksiyonun içerdiği total fenolik madde miktarının belirlenmesinde Ragazzi ve Veronose (1973) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Yöntemin uygulanması sonucunda elde edilen, gallik asit standartlarına ait OD₇₂₅ değerleri absise, gallik asit standartlarının derişim değerleri ise ordinata konularak standart grafik çizildi ve doğru denklemi oluşturuldu (Şekil 4.2). Örneklerin içerdiği fenolik madde miktarları standart grafiğe ait doğru denklemi yardımıyla hesaplandı. Sonuç olarak kullanılan zeytinyağının fenolik içeriğinin 19.76 ± 0.5 mg gallik asit eşdeğeri/ kg olduğu belirlendi.



Şekil 4.2. Gallik asit standart grafiği ($R^2= 0.99$).

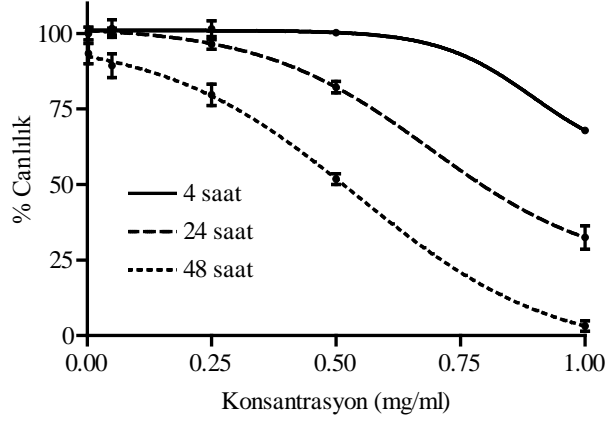
4.3. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

ZFF, GA ve oksidatif stres oluşturmak için kullanılan H₂O₂'in derişimi ve uygulama süresine bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri MTT analizi ile belirlendi. ZFF ve GA stokları hazırlanırken kullanılan DMSO'in hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, besiyerinde % 0.125 DMSO bulunmasının canlılık üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi.

4.3.1. Zeytinyağı Fenolik Fraksiyonunun Sitotoksik Etkisi

Yapılan sitotoksosite analizleri sonucunda ZFF uygulaması sonucu canlı hücre sayısını %50 düşüren madde derişimi (IC₅₀), sadece 48 saatlik uygulama için 514 µg/ml olarak hesaplanabildi (Şekil 4.3). Test edilen derişim aralığındaki (0.0025- 1 mg/ml) ZFF'nun 4 ve 24 saatlik uygulamalarıyla kaydedilen ölüm oranları IC₅₀ değerinin sağlıklı bir şekilde hesaplanmasına olanak verecek ölçüde gerçekleşmedi. Bu analiz sonuçlarına

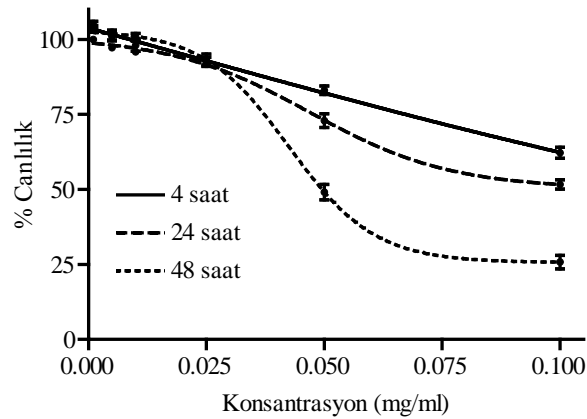
göre; çalışmanın daha sonraki aşamalarında istatistiksel verilerle sitotoksik etkisi olmadığı belirlenen 95 µg/ml derişimde ZFF kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.3: 4, 24 ve 48 saat ZFF uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

4.3.2. Gallik Asitin Sitotoksik Etkisi

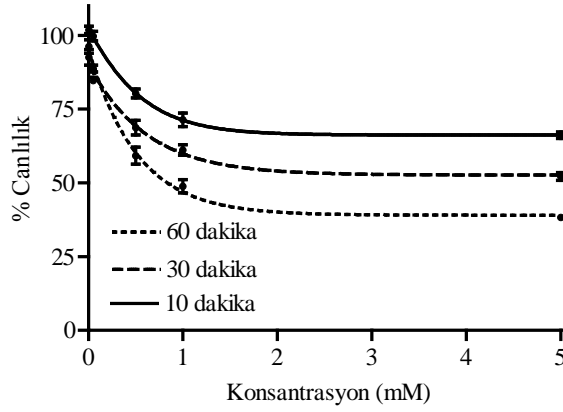
GA için yapılan sitotoksisite analizleri sonucunda IC₅₀ değeri sadece 48 saatlik uygulama için 50 µg/ml olarak hesaplanabildi (Şekil 4.4). Test edilen derişim aralığındaki (0.001- 0.1 mg/ml) GA'ın 4 ve 24 saatlik uygulamalarıyla kaydedilen ölüm oranları IC₅₀ değerinin sağlıklı bir şekilde hesaplanmasına olanak verecek ölçüde gerçekleşmedi. Bu analiz sonuçlarına göre; çalışmanın daha sonraki aşamalarında istatistiksel verilerle sitotoksik etkisi olmadığı belirlenen 28 µg/ml derişimde GA kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.4: 4, 24 ve 48 saat GA uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

4.3.3. Hidrojen Peroksitin Sitotoksik Etkisi

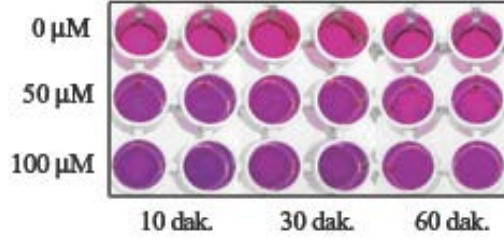
H₂O₂ ile yapılan sitotoksosite analizleri sonucunda IC₅₀ değeri sadece 60 dakikalık uygulama için 808 µM olarak hesaplandı (Şekil 4.5). Test edilen derişim aralığındaki (0.005- 5 mM) H₂O₂'in 10 ve 30 dakikalık uygulamalarıyla kaydedilen ölüm oranları IC₅₀ değerinin sağlıklı bir şekilde hesaplanmasına olanak verecek ölçüde gerçekleşmedi. Sitotoksosite analiz sonuçlarına göre; çalışmamızın daha sonraki aşamalarında uygulanacak farklı deney sistemlerinin ve kullanılacak tekniklerin duyarlılık sınırları içinde kalmak kaydıyla IC₅₀ değerinin altında bulunan, farklı derişimlerde (50- 750 µM) H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturulması kararlaştırıldı.



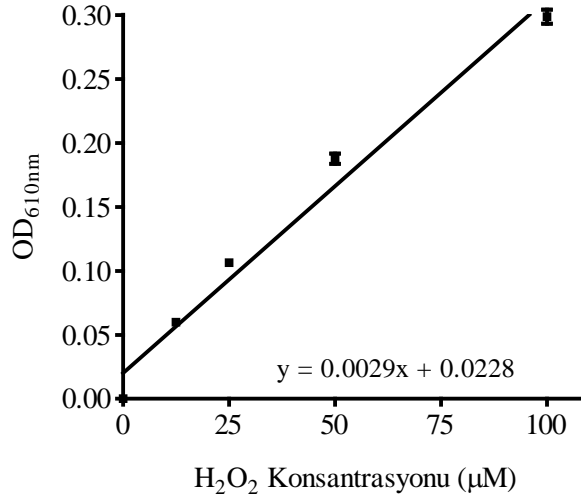
Şekil 4.5: 10, 30 ve 60 dakika H₂O₂ uygulamasının HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

4.3.3.1. Besiyerinde Kalan H₂O₂ Derişimi

HeLa hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak için kullanılan H₂O₂'in hücre içine alınımının zamana göre değişimini belirlemek ve ZFF veya GA'in bu alım üzerine etkisini incelemek için, deneysel koşullarda besiyerinde kalan H₂O₂ miktarı "fenol kırmızısı yöntemi" ile belirlendi. Bu yöntem; yaban turbu peroksidazı (HRP) varlığında, H₂O₂ bağımlı bir reaksiyonla pembe renkli olan fenol kırmızısının okside olması sonucu reaksiyon karışımının mor renk alması esasına dayanan kolorimetrik bir yöntemdir (Şekil 4.6). Yöntem uygulanırken hazırlanan standart grafikte 100 µM'ın üstündeki H₂O₂ derişimlerinde doğrusallığın kaybolmasından dolayı bu yöntem sadece 50 ve 100 µM H₂O₂ ile gerçekleştirildi (Pick ve Keisari, 1980). Besiyerindeki H₂O₂ miktarının belirlenmesi için kullanılan standart grafik Şekil 4.7'de verildi.

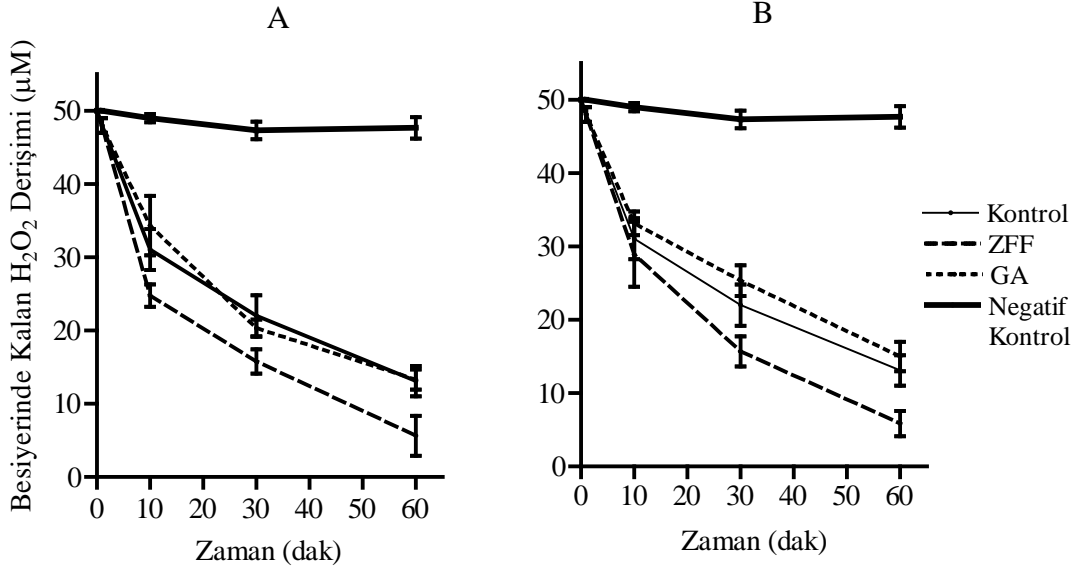


Şekil 4.6: Besiyerinde kalan H₂O₂ miktarının belirlenmesinde kullanılan fenol kırmızı yönteminde gözlenen renk değişimleri

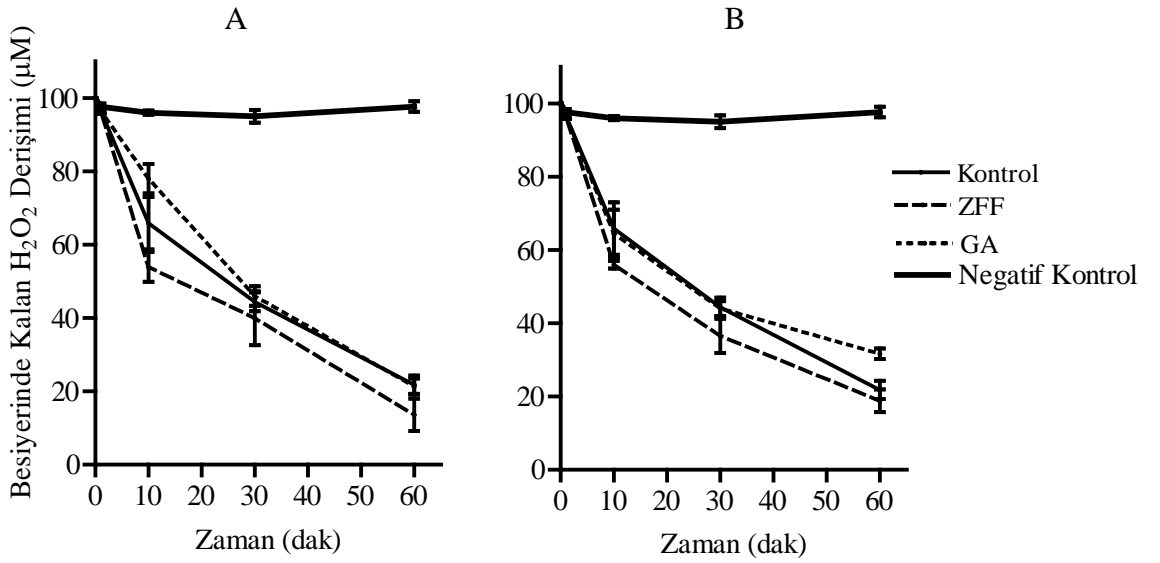


Şekil 4.7: H₂O₂ standart grafiği (R²= 0.97).

Hüresiz ortamda H₂O₂'in oldukça kararlı olduğu gözlemlendi ve besiyerindeki H₂O₂ derişimindeki düşüşün, bu maddenin hücreye girişinden kaynaklandığı anlaşıldı (Yakes ve van Houten, 1997). Elde edilen sonuçlar, 60 dakika uygulanan her iki dozun da büyük oranda (~% 80) hücrelerin içine girdiğini ortaya koydu (Şekil 4.8 ve 4.9). Ayrıca 50 ve 100 µM H₂O₂ uygulanan kontrol grubu ile 4 veya 48 saat; ZFF veya GA ile uygulama yapılan deney grupları arasında besiyerindeki H₂O₂ derişim derişimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 4.8: 50 μM H_2O_2 uygulamasında zamana bağlı olarak besiyerindeki H_2O_2 derişimindeki değişim. A) 4 saat uygulama yapılmış hücrelerin besiyerindeki H_2O_2 derişim değişimi, B) 48 saat uygulama yapılmış hücrelerin besiyerindeki H_2O_2 derişim değişimi. (Kontrol: Sadece H_2O_2 uygulanmış hücreler, ZFF: 95 $\mu\text{g/ml}$ ZFF ve H_2O_2 uygulanmış hücreler, GA: 28 $\mu\text{g/ml}$ GA ve H_2O_2 uygulanmış hücreler, Negatif Kontrol: hücretsiz ortamdaki H_2O_2)



Şekil 4.9: 100 μM H_2O_2 uygulamasında zamana bağlı olarak besiyerindeki H_2O_2 derişimindeki değişimi. A) 4 saat uygulama yapılmış hücrelerin besiyerindeki H_2O_2 derişim değişimi, B) 48 saat uygulama yapılmış hücrelerin besiyerindeki H_2O_2 derişim değişimi. (Kontrol: Sadece H_2O_2 uygulanmış hücreler, ZFF: 95 $\mu\text{g/ml}$ ZFF ve H_2O_2 uygulanmış hücreler, GA: 28 $\mu\text{g/ml}$ GA ve H_2O_2 uygulanmış hücreler, Negatif Kontrol: hücretsiz ortamdaki H_2O_2)

4.5. HÜCRE İÇİ ROT DÜZEYİ

Deney ve kontrol koşullarında HeLa hücrelerinde oluşan ROT miktarı, indirgenmiş 2',7'-diklorofloresin diasetatın (DCFH) hücre içindeki ROT tarafından diklorofloresin'e (DCF) oksitlenmesi sonucu yaydığı fluoresansın ölçülmesi ile bağıl olarak belirlendi. Stres uygulanmadığı koşullarda 4 saatlik ZFF veya GA uygulamasının hücre içi ROT miktarını sırasıyla % 9.95 ve % 8.66 oranında azalttığı, 24 saatlik ZFF veya GA uygulamasının ise sırasıyla % 7.7 ve % 6.99 oranında azalttığı ve 48 saatlik uygulamanın ise herhangi bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi (Tablo 4.1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 saatlik uygulamalar istatistiksel olarak çok anlamlı ($p < 0.01$); 24 saatlik uygulamalar ise anlamlı ($p < 0.05$) bir düşüş gösterdi.

Tablo 4.1: 95 µg/ml ZFF veya 28 µg/ml GA uygulanmış HeLa hücrelerindeki bağıl hücre içi ROT miktarları.

	Uygulama Süresi (Saat)		
	4	24	48
Kontrol	100.00 ± 0.29	100.00 ± 0.29	100.00 ± 0.29
200 µM H ₂ O ₂	119.20 ± 1.72**	119.20 ± 1.72**	119.20 ± 1.72**
ZFF	90.05 ± 1.69 **	92.30 ± 2.58 *	103.20 ± 1.19
GA	91.34 ± 1.69 **	93.01 ± 2.69 *	94.80 ± 2.96

Kontrol ile karşılaştırıldığında; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Tablo 4.2: 95 µg/ml ZFF veya 28 µg/ml GA uygulamalarından sonra 200 µM H₂O₂ ile 1 saat işleme sokulmuş HeLa hücrelerindeki bağıl hücre içi ROT miktarları.

	Uygulama Süresi (Saat)		
	4	24	48
200 µM H ₂ O ₂	99.51 ± 5.27	99.51 ± 5.27	99.51 ± 5.27
ZFF	75.19 ± 5.19 **	79.81 ± 5.97 **	89.36 ± 2.98 **
GA	77.49 ± 4.93 **	79.20 ± 4.37 **	83.87 ± 5.73 **

200 µM H₂O₂ uygulanmış deney grubu ile karşılaştırıldığında; **: $p < 0.01$

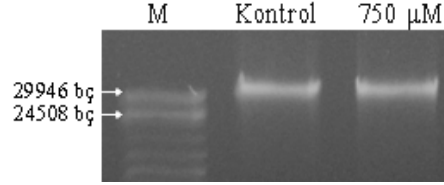
Tek tabaka halinde kültür kabına tutunan HeLa hücrelerine yüzeyden ayrılmasına yol açmayacak düzeyde (200 µM H₂O₂ ile) stres uygulandığında ise, ZFF veya GA ile ön uygulama yapılmasının hücre içi ROT miktarı düzeyini belirgin bir şekilde azalttığı görüldü (Tablo 4.2). Gerek ZFF gerekse GA için, tüm uygulamalarda kontrole göre kaydedilen düşüşler istatistiksel olarak çok anlamlı ($p < 0.01$) bulundu.

ZFF ve GA ile 4 ve 24 saat yapılan ön uygulamalar, hücre içi ROT düzeyini H₂O₂ uygulanmamış kontrol hücrelerinden bile daha düşük düzeye indirgedi. 4 saatlik ön uygulamanın 24 saatlik ön uygulamaya göre daha etkin olduğu görüldü.

4. 6. DNA HASARI

4.6.1. DNA İzolasyonu

DNA hasarının belirlenmesinde kullanılmak üzere 750 µM H₂O₂ ile oksidatif strese sokulmuş HeLa hücrelerinden izole edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezindeki kontrolleri sonucunda, yüksek moleküler ağırlığa sahip hücresel DNA'nın başarıyla izole edildiği belirlendi (Şekil 4.10). Miktarları fluorometrik olarak belirlenen DNA örnekleri QPCR analizinde kullanılabilecek kadar -20 °C'da saklandı.

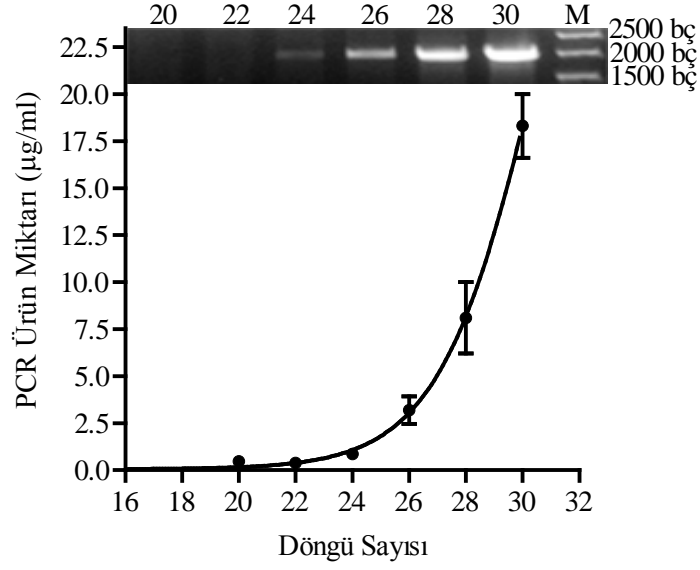


Şekil 4.10: 750 µM H₂O₂ uygulanmış HeLa hücrelerinden (~3x10⁶) izole edilen DNA örnekleri. (M: Marker; SM0351, Fermentas)

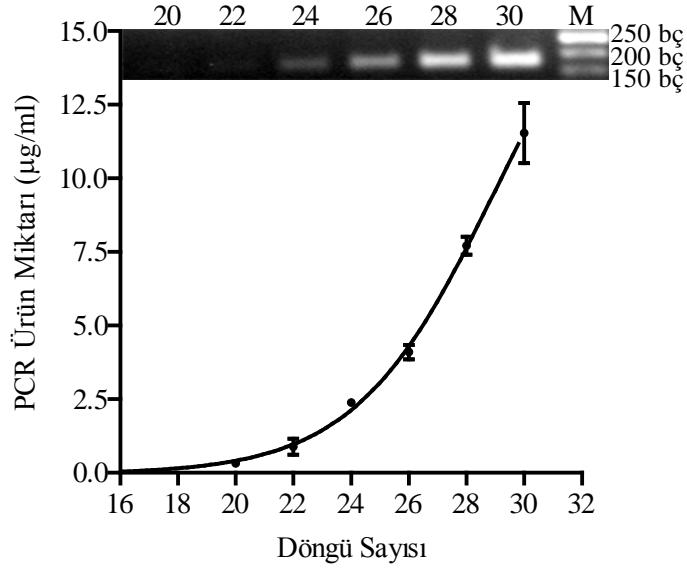
4.6.2. QPCR Optimizasyonu

QPCR analizinin temeli; hedef dizideki DNA hasarlarının DNA polimerazın iş görmesini engelleyerek PCR ürün miktarını düşürmesi esasına dayanır. Ürün miktarındaki bu azalma ancak reaksiyonda, ürünün üssel artış gösterdiği eksponensiyal faz içindeki bir döngü sayısı ve uygun kalıp miktarı kullanılarak gözlenebilir (Grimaldi ve diğ., 2002). Bu nedenle ilk olarak, daha önce QPCR analizi için kullanılmamış olan üç farklı bölgenin ve iki internal kontrolün optimizasyonları gerçekleştirildi.

DNA hasarının belirlenmek istendiği APEX genine ait 2082 bç'lik ve nDNA için internal kontrol olarak kullanılacak olan 180 bç'lik dizinin PCR ürünlerinin döngü sayısına bağlı üssel değişim grafiği Şekil 4.11. ve 4.12.'de verildi. APEX genine ait 2082 bç'lik diziyeye ait QPCR analizinde 27 döngülük reaksiyonun, 180 bç'lik diziyeye ait QPCR analizinde ise 25 döngülük reaksiyonun uygun olacağına karar verildi.



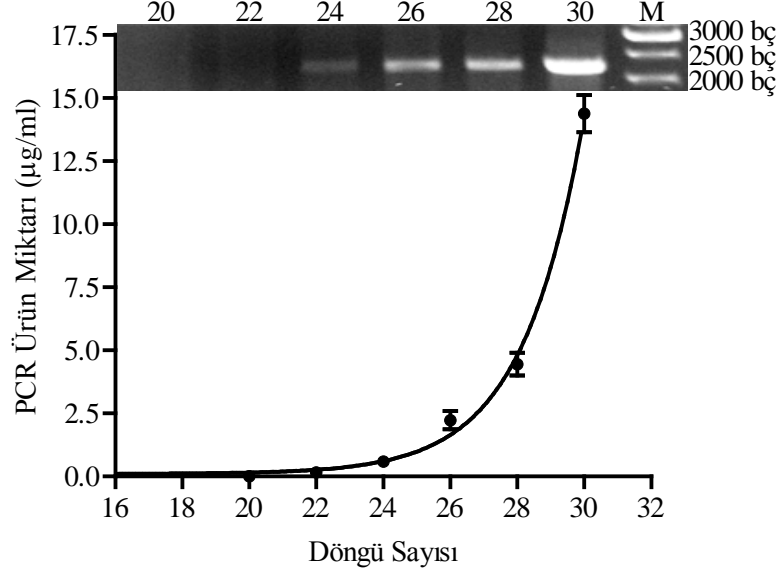
Şekil 4.11. APEX genine ait 2082 bç'lik (APEX-U) dizinin 20, 22, 24, 26, 28 ve 30 döngülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).



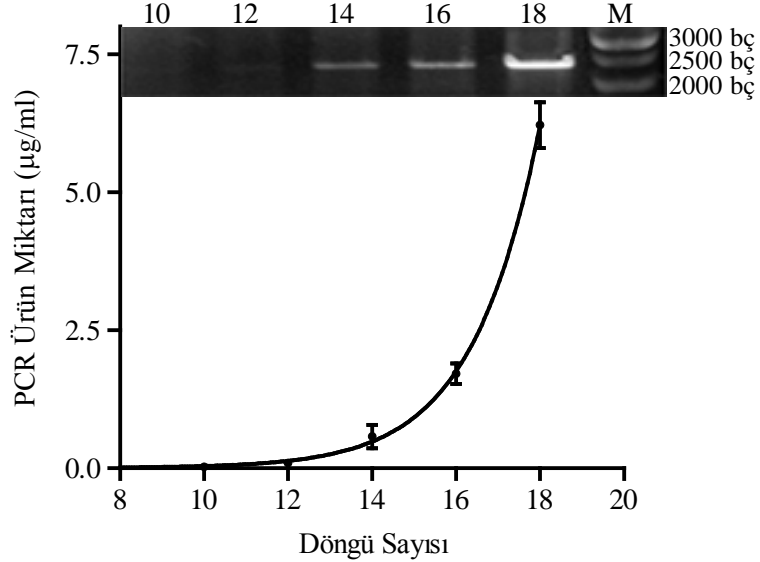
Şekil 4.12: APEX genine ait 180 bç'lik (APEX-K) dizinin 20, 22, 24, 26, 28 ve 30 döngülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0371, Fermentas).

β -globin gen kümesinin 2334 bç'lik dizisine ait PCR ürününün döngü sayısına bağlı üssel değişim grafiğine (Şekil 4.13) göre QPCR analizinde kullanılmak üzere 27 döngülük reaksiyonun uygun olacağına karar verildi. mtDNA'ya ait 2232 bç'lik ve 161 bç'lik dizilerin PCR ürünlerinin döngü sayısına bağlı üssel değişim grafiklerine (Şekil

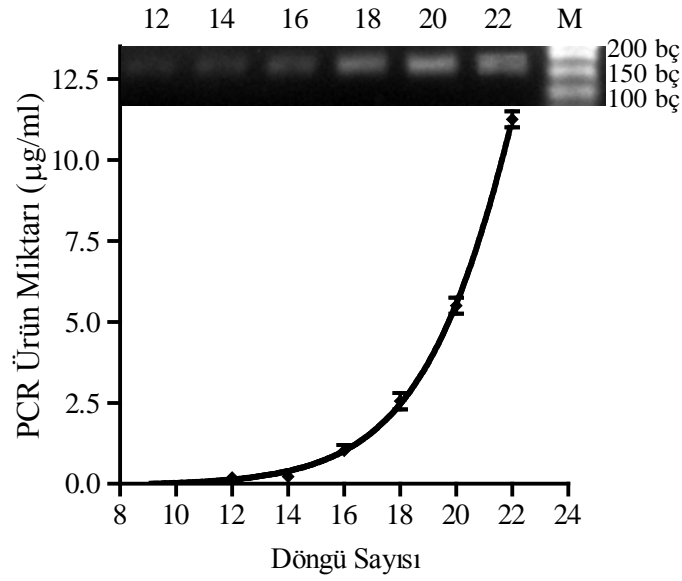
4.14 ve 4.15) göre, 2232 bç'lik dizi için 16 döngülük, 161 bç'lik dizi içinse 18 döngülük QPCR yapılmasının uygun olacağına karar verildi. Bu grafiklere göre her bir bölgenin QPCR analizi için uygun bulunan koşullar Tablo 3.4, 3.5. ve 3.6.'da verildi.



Şekil 4.13: β -globin gen kümesine ait 2334 bç'lik (BETA) dizinin 20. 22, 24, 26, 28 ve 30 döngülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).

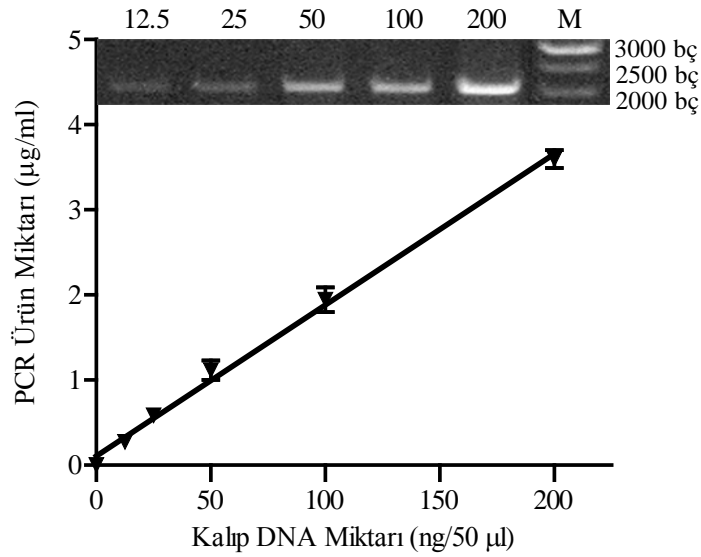


Şekil 4.14: mtDNA'ya ait 2232 bç'lik (COX-U) dizinin 10. 12, 14, 16 ve 18 döngülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).

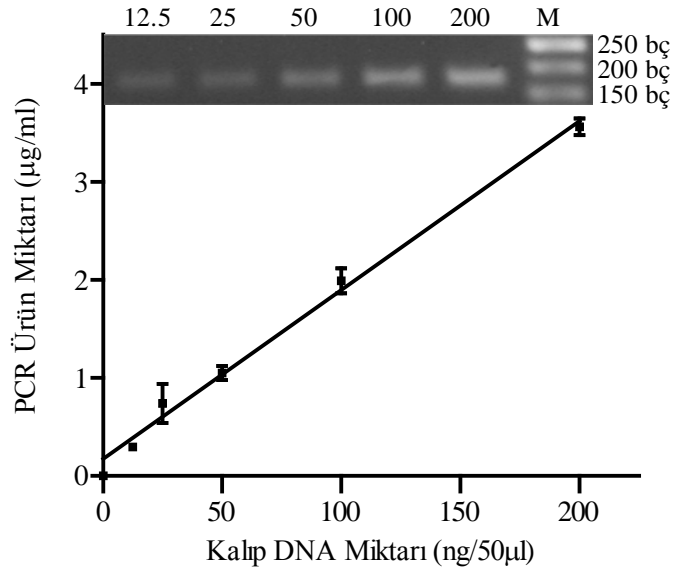


Şekil 4.15: mtDNA'ya ait 161 bç'lik (COX-K) dizinin 12, 14, 16, 18, 20 ve 22 döngülük PCR'ı sonucunda oluşan ürünlerin miktarlarına ait grafik ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0371, Fermentas).

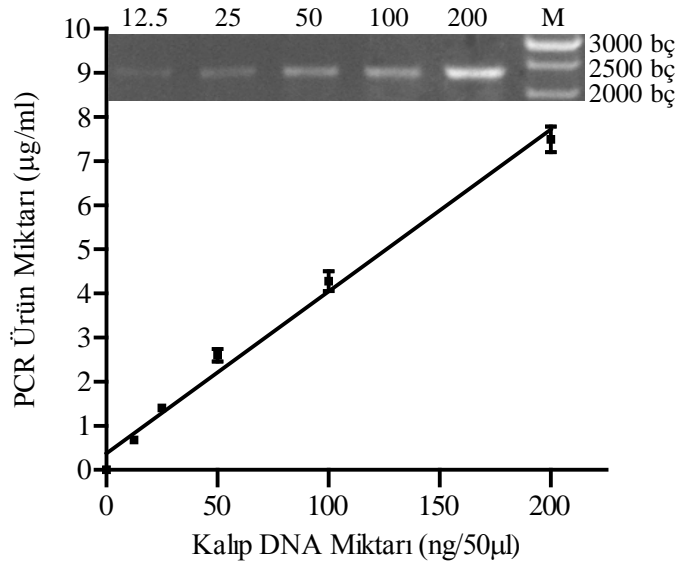
Tüm PCR ürünleri için, ürün miktarının kalıp miktarı ile doğru orantılı olarak arttığını görmek ve uygun kalıp miktarına karar vermek için 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen ürünlerin miktarlarıyla çizilmiş grafikler Şekil 4.16.- 4.20.'de görülmektedir. Kalıp optimizasyonu sonuçlarına göre QPCR analizi için uygun görülen kalıp miktarları Tablo 3.3.'te verilmiştir.



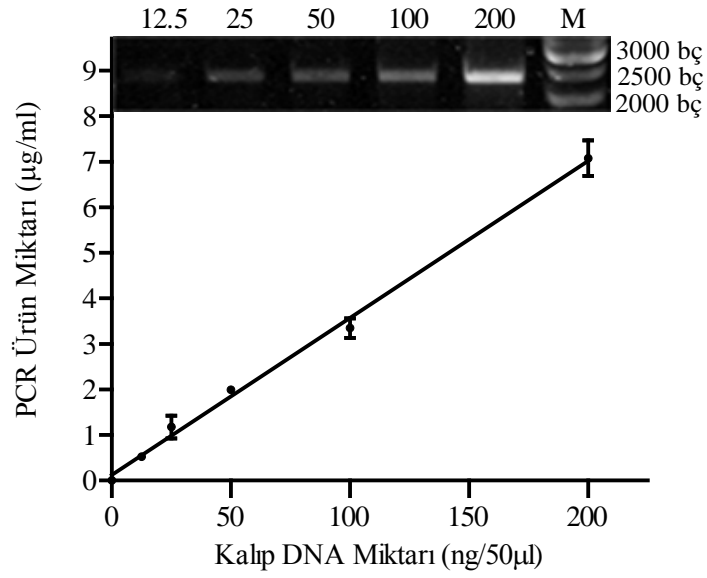
Şekil 4.16: APEX genine ait 2082 bç'lik (APEX-U) dizinin 50 µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 27 döngülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).



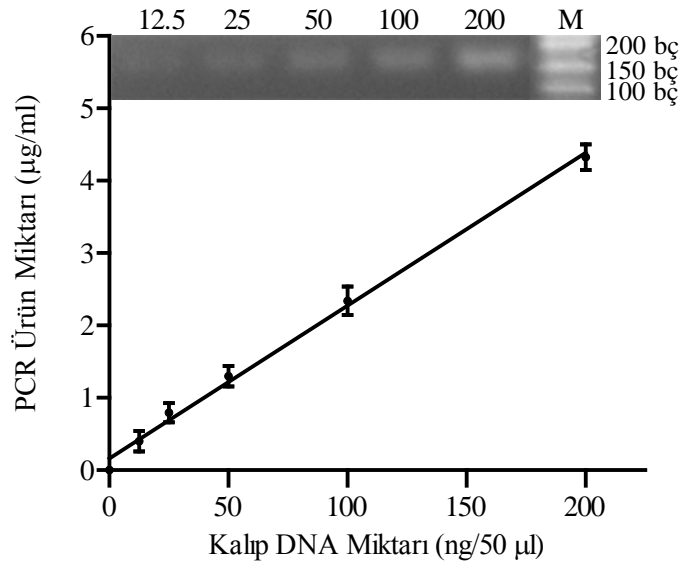
Şekil 4.17: APEX genine ait 180 bp'lik (APEX-K) dizinin 50 µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 25 döngülük PCR'i sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0371, Fermentas).



Şekil 4.18: β-globin gen kümesine ait 2334 bp'lik (BETA) dizinin 50 µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 27 döngülük PCR'i sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).



Şekil 4.19: mtDNA'ya ait 2232 bç'lik (COX-U) dizinin 50 µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 16 döngülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0331, Fermentas).

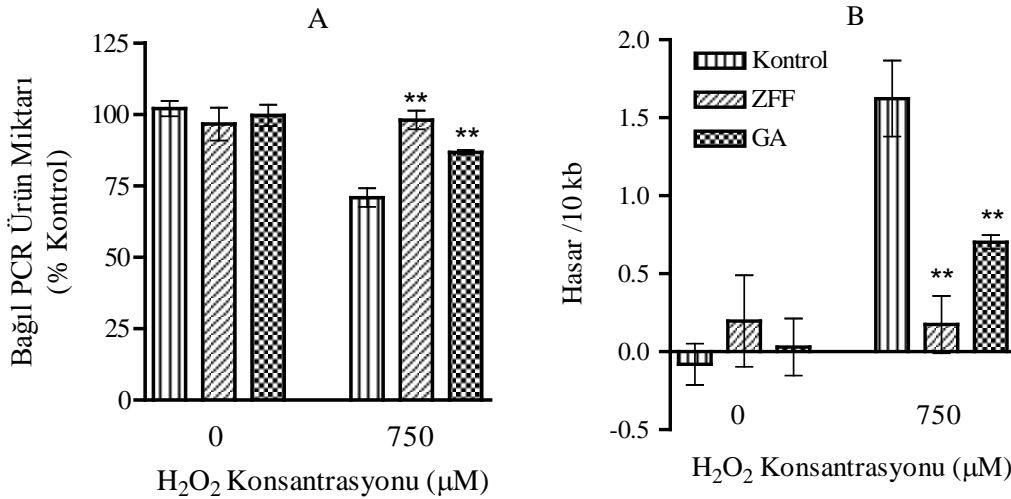


Şekil 4.20: mtDNA'ya ait 161 bç'lik (COX-K) dizinin 50 µl reaksiyon hacmi içinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng kalıp DNA ile 18 döngülük PCR'ı sonucu elde edilen ürün miktarları ve jel görüntüsü (M: Marker; SM0371, Fermentas).

4.6.3. QPCR Analizi

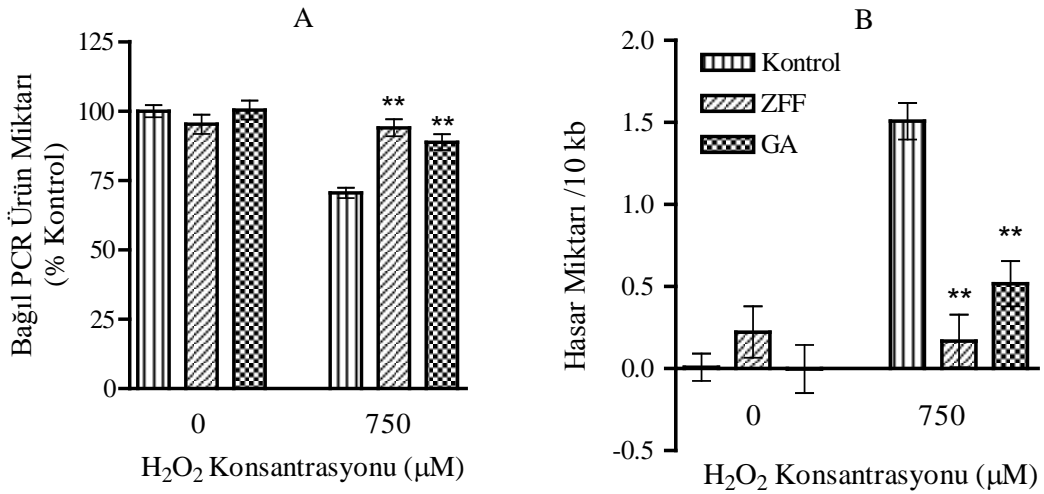
HeLa hücrelerinde H_2O_2 'in meydana getireceği DNA hasarlarının belirlenmesi amacıyla QPCR analizi yapıldı. Oksidatif stres uygulanmamış ve $750 \mu M H_2O_2$ ile 1 saat uygulama yapılarak oksidatif strese maruz bırakılmış hücrelerden izole edilen DNA'lar ile QPCR analizleri gerçekleştirildi.

APEX-U bölgesinde gerçekleştirilen QPCR analizi sonucunda oksidatif stres uygulanmayan hücrelerde ($0 \mu M H_2O_2$) hasar oluşumu üzerine ZFF ve GA uygulamasının herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.21). $750 \mu M H_2O_2$ ile oluşturulan oksidatif stres koşulunda ise bu bölgede 10 kb'lik dizi başına ~ 1.6 hasar olduğu, ZFF uygulamasının hasarı tamamen önlediği, GA uygulamasının ise hasarı belirgin düzeyde ($p < 0.01$) düşürdüğü belirlendi.



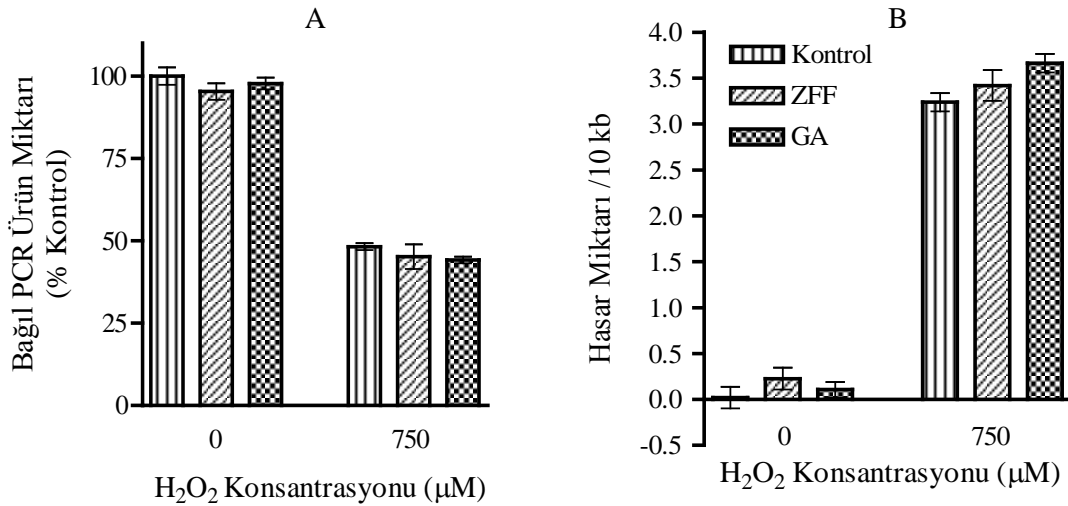
Şekil 4.21: APEX-U dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağlı PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lik dizi başına hasar (**: $p < 0.01$).

β -globin gen kümesine ait bölgede gerçekleştirilen QPCR analizi sonucunda oksidatif stres uygulanmayan hücrelerde ($0 \mu M H_2O_2$) hasar oluşumu üzerine ZFF ve GA uygulamasının herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.22). $750 \mu M H_2O_2$ ile oluşturulan oksidatif stres koşulunda ise bu bölgede 10 kb'lik dizi başına ~ 1.5 hasar olduğu, ZFF uygulamasının hasarı tamamen önlediği, GA uygulamasının ise hasarı belirgin düzeyde ($p < 0.01$) düşürdüğü belirlendi.



Şekil 4.22: BETA dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağlı PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lık dizi başına hasar (**: $p < 0.01$).

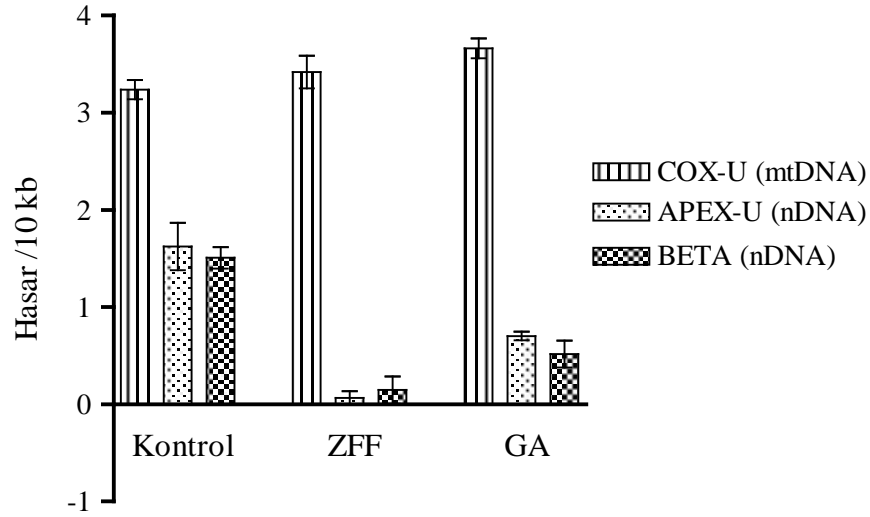
mtDNA'ya ait bölgede gerçekleştirilen QPCR analizi sonucunda oksidatif stres uygulanmayan hücrelerde hasar oluşumu üzerine ZFF ve GA uygulamasının herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.23). 750 µM H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stres koşullarında ise bu bölgede 10 kb'lık dizi başına ~3.2 hasar oluştuğu, ZFF veya GA uygulamasının hasarı önlemede herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.



Şekil 4.23: COX-U dizisine ait QPCR analiz sonuçları. A) Bağlı PCR ürün miktarı (% Kontrol), B) 10 kb'lık dizi başına hasar.

Oksidatif stres uygulaması sonrasında transkripsiyonel olarak aktif olan (APEX-U) nDNA bölgesi ile inaktif olan (BETA) nDNA bölgesi arasında hasar frekansı bakımından anlamlı bir farklılık bulunmazken, mtDNA'da her iki nDNA bölgesinden ~2 kat fazla hasar olduğu belirlendi (Şekil 4.24).

Sonuç olarak ZFF uygulamasının her iki nDNA bölgesinde de oksidatif stres sonucu oluşan hasarları tamamen önlediği, GA'nin ise etkin bir şekilde önleyici etki gösterdiği, fakat mtDNA'da oluşan hasarlar üzerinde her iki uygulamanın da bir etkisinin olmadığı belirlendi.



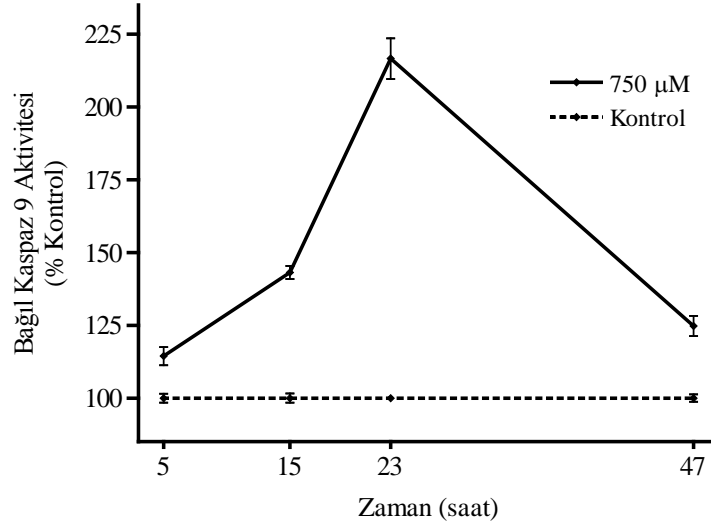
Şekil 4.24: 750 µM H₂O₂ uygulanmış HeLa hücrelerinde farklı gen bölgelerine ait hasar frekanslarının karşılaştırılması ZFF: 95 µg/ml ZFF, GA: 28 µg/ml GA uygulanmış hücreler .

4.7. ENZİMATİK ANALİZLER

4.7.1. Kaspaz 9 Aktivitesi

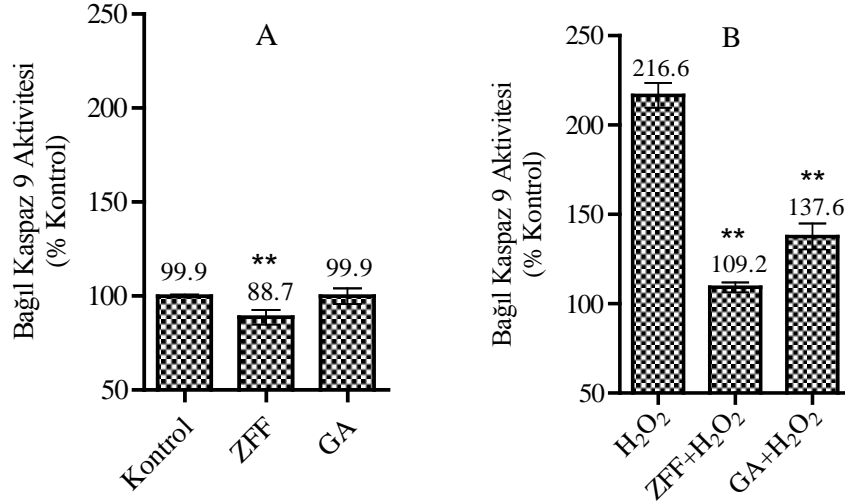
Kaspaz aktivasyonu apoptotik hücre ölümünün en önemli kanıtı olarak kabul edilir. HeLa hücre kültürlerinde 750 µM H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stresin apoptozu hangi düzeyde uyardığını belirlemek amacıyla apoptozun hücre içi yolağında temel rol alan kaspaz 9 aktivitesi ölçüldü. Oksidatif stres sonucunda enzimatif aktivitenin en üst düzeye çıktığı zamanın belirlenebilmesi için, H₂O₂ uygulamasından sonra hücreler taze besiyeri eklenerek 5, 15, 23 ve 47 saat normal kültür şartlarında inkübe edildi ve her bir sürenin sonunda kaspaz 9 enzim aktivitesi belirlendi (Barbouti ve diğ., 2002) (Şekil 4.25).

Elde edilen bulgulara göre kaspaz 9 aktivitesinin ölçümü için en uygun zamanın maksimum aktivitenin belirlendiği H₂O₂ uygulamasından sonraki 23. saat olduğu anlaşıldı. 750 µM H₂O₂ uygulaması sonucunda kaspaz 9 aktivitesinde, kontrole göre ~2.2 kat artış belirlendi. Hücre içi ROT düzeyini düşürme bakımından, ZFF ve GA uygulamaları içinde en etkin olanın 4 saatlik uygulamalar olduğu daha önce belirlendiğinden (bkz. Tablo 4.2), deney koşullarındaki aktivite çalışmaları bu grupta yürütüldü.



Şekil 4.25: 750 µM H₂O₂ uygulaması sonrasında 5, 15, 23 ve 47 saat normal kültür koşullarında inkübe edilen hücrelerin bağıl kaspaz 9 aktivitesi.

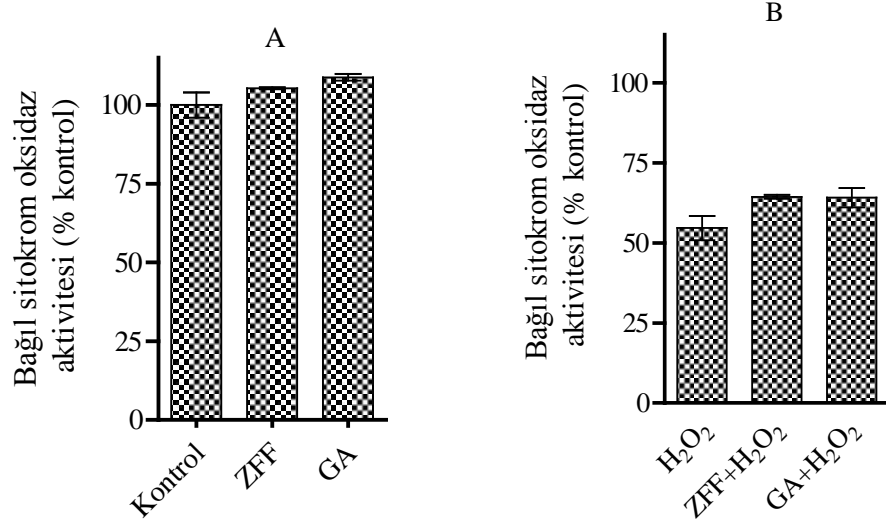
ZFF ile 4 saatlik ön uygulama sonucunda kaspaz 9 aktivitesinin kontrol grubu hücrelere göre anlamlı ölçüde (~% 11.2) azaldığı, GA ile ön uygulamanın ise kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlendi (Şekil 4.26). ZFF ve GA ile ön uygulama yapıldıktan sonra oksidatif strese sokulan hücrelerde ise ZFF'nun kaspaz 9 aktivitesini ~2 kat azaltarak kontrol hücreleri ile aynı düzeyde kalmasını sağladığı, GA'in ise kaspaz 9 aktivitesini önemli düzeyde ($p < 0.01$) (~1.6) azalttığı belirlendi.



Şekil 4.26: Bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi **A**) 4 saat ZFF veya GA ile uygulama yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi **B**) 4 saat ZFF veya GA ile ön uygulama ve 750 μM H₂O₂ uygulaması yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi. (** : $p < 0.01$, **Kontrol**: Hiçbir uygulama yapılmamış hücreler, **ZFF**: 95 $\mu\text{g/ml}$ ZFF uygulanmış hücreler, **GA**: 28 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulanmış hücreler, **H₂O₂**: 750 μM H₂O₂ uygulanmış hücreler, **ZFF+H₂O₂**: 95 $\mu\text{g/ml}$ ZFF ve 750 μM H₂O₂ uygulanmış hücreler, **GA+H₂O₂**: 28 $\mu\text{g/ml}$ GA ve 750 μM H₂O₂ uygulanmış hücreler)

4.7.2. Sitokrom C Oksidaz Enzim Aktivitesi

Sitokrom oksidaz enzim aktivitesi, H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stresin ve ZFF ve GA'in mitokondriyal redoks fonksiyonu üzerindeki etkisini belirlemek için ölçüldü. ETZ'nin son elektron alıcısı olan sitokrom oksidaz enzim aktivitesi üzerine ZFF ve GA ile ön uygulama yapılması anlamlı bir farklılık oluşturmadı (Şekil 4.27, A). 750 μM H₂O₂ uygulamasından 5 saat sonra yapılan ölçüm sonucunda bu enzimin aktivitesinin ~% 44 azaldığı, ZFF ve GA ile 4 saat ön uygulama yapılmasının ise bu azalma üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.27, B).



Şekil 4.27: Bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi **A**) 4 saat ZFF veya GA ile uygulama yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi **B**) 4 saat ZFF veya GA ile ön uygulama ve 750 µM H₂O₂ uygulaması yapılmış HeLa hücrelerindeki bağıl sitokrom c oksidaz enzim aktivitesi. (**Kontrol**: Hiçbir uygulama yapılmamış hücreler, **ZFF**: 95 µg/ml ZFF uygulanmış hücreler, **GA**: 28 µg/ml GA uygulanmış hücreler, **H₂O₂**: 750 µM H₂O₂ uygulanmış hücreler, **ZFF+H₂O₂**: 95 µg/ml ZFF ve 750 µM H₂O₂ uygulanmış hücreler, **GA+H₂O₂**: 28 µg/ml GA ve 750 µM H₂O₂ uygulanmış hücreler)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser gelişimi, yaşlanma ve dejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu ortaya konulmuş olan oksidatif DNA hasarının en önemli nedeni hücrel metabolizma kaynaklı, özellikle enerji merkezi olan mitokondrinin ETZ'nde oluşan ROT'dir. ROT'nin hücrelerde meydana getirdiği moleküler hasarlar ve bunların önlenmesine ilişkin araştırmalarda çeşitli oksidatif stres ajanlarından yararlanılmaktadır. Bu çalışmada oksidatif stres oluşturmak için kullanılan H_2O_2 , hücrel zarlardan su molekülü ile benzerliğinden dolayı kolaylıkla geçerek (Bienert ve diğ., 2006) Fenton reaksiyonu aracılığıyla en reaktif türlerden biri olan OH^* 'e dönüşebilen oldukça tehlikeli bir maddedir. H_2O_2 'in OH^* aracılığıyla, doza bağlı olarak oksidatif DNA hasarına yol açtığı iyi bilinmektedir (Jaruga ve Dizdaroğlu, 1996; Yakes ve van Houten, 1997; Ballinger ve diğ., 2000; Jin ve diğ., 2001; Sawyer ve diğ., 2003; Bennetts ve Aitken, 2005; Bennetts ve diğ., 2008). Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarlarını önleyici doğal bileşikler ve antioksidanlar konusunda çok sayıda araştırma yürütülmüştür (Duthie ve diğ., 1997; Abalea ve diğ., 1999; Collins ve Horvathova, 2001; Lima ve diğ., 2006; Garcia-Alonso ve diğ., 2007). Zeytinyağının da benzer bir etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Deiana ve diğ., 1999; Antunes ve Takahashi, 1999; Budiyanto ve diğ., 2000; Ichihashi ve diğ., 2000; Quiles ve diğ., 2002a; Weinbrenner ve diğ., 2004; Nouis ve diğ., 2005; Salvini ve diğ., 2006; Machowertz ve diğ., 2007; Guo ve diğ., 2010).

Bu çalışmada, zeytinyağı fenolik fraksiyonunun (ZFF) normal fizyolojik koşullarda ve oksidatif stres altında HeLa hücrelerindeki DNA hasarları üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, ZFF içeriğinde varlığı bilinen gallik asit (GA) referans olarak kullanılmış, H_2O_2 ile strese sokulmadan önce hücrelere ZFF veya GA uygulaması yapılmıştır. İlk aşamada gerçekleştirilen sitotoksosite analizleri sonucunda uygulama derişimleri olarak ZFF için 95 $\mu g/ml$, GA için 28 $\mu g/ml$ seçilmiştir. Zeytinyağında bulunan gallik asit, antioksidan aktiviteye sahip polifenolik bir bileşiktir (Yoshino ve

diğ., 2002). Farklı gıda maddelerindeki yağları bozulmaya karşı korumak için serbest radikal süpürücü aktivitesinden dolayı besin katkısı olarak geniş çapta kullanılır (Nakagawa ve diğ., 1997). Ancak gallik asitin çeşitli türevlerinin pro-oksidan etkisinden dolayı bazı hücre ve doku tiplerinde apoptotik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olup bu çalışmalarda uygulanan dozlar bileşiğin IC₅₀ dozunun çok üstündeki dozlardır (Inoue ve diğ., 1995; Sakaguchi ve diğ., 1998). ZFF'nin Jurkat (Nousis ve diğ., 2005) ve HL60 ve mononükleer kan hücreleri (Fabiani ve diğ., 2008) üzerindeki koruyucu etkisi daha önce belirlenmiş olmasına rağmen, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ilk kez bu çalışmada ortaya konulmuştur.

Oksidatif stres ajanı olarak kullanılan H₂O₂'in hücre içine girişi, besiyerinde kalan miktarının belirlenmesiyle, dolaylı yoldan gösterilmiştir. Bulgular, Yakes ve van Houten (1997)'in transforme fibroblast hücrelerinde, Ballinger ve diğ. (1999)'nin insan transforme retinal pigment epitel hücrelerinde gözlemlediği H₂O₂ tüketimine ilişkin bulgularla paralellik göstermiştir. Bir saatlik uygulama süresi sonunda H₂O₂'in büyük bir kısmının (~% 80) hücre içine girdiği ve hücre içi ROT düzeyini artırarak hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturduğu belirlenmiştir. ZFF veya GA ile ön uygulama yapılan hücreler ile herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler arasında H₂O₂'in hücre içine alınımı bakımından anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. H₂O₂'in zarlardan taşınımına ilişkin bir derlemede (Bienert ve diğ., 2006) H₂O₂'in hücre içi ile hücre dışı dengesinin, alımda iş gören mekanizmalar (difüzyon, akuaporin-aracılı taşınma) ile hücre içi üretim ve bozunma dengesine bağlı olduğu vurgulanmaktadır. Buna göre, bu çalışmada uygulanan ZFF ve GA'in bu dengeyi değiştirecek bir etki yapmadığı anlaşılmıştır. H₂O₂ bozunmasında doğrudan bir etkisi bulunmadığı bilinen fenolik fraksiyonun, H₂O₂ alımını değiştirmedeği düşünülebilir. Ancak bu dengenin değişmeme nedenlerinden biri de uygulanan H₂O₂ dozunun çok düşük kalma olasılığıdır. Uygulanan heriki konsantrasyonun da düşük oranda hücre ölümüne sebep olması (hücre canlılığını 50 µM H₂O₂ ~% 10, 100 µM H₂O₂ ise ~% 15 inhibe eder) bu öngörüğü desteklemektedir.

Hücre içine giren H₂O₂'nin beklenen ilk etkisi, hücre içi ROT düzeyini artırmasıdır. Bu nedenle çalışmanın 2. aşamasında tüm deney ve kontrol gruplarında hücre içi ROT düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. ZFF uygulaması hem normal hem de oksidatif

stres koşullarında hücre içi ROT miktarını belirgin düzeyde azaltmıştır. Bu etki referans olarak kullanılan GA'in etkisi ile benzerdir. ZFF hücre içi ROT düzeyini doğrudan antioksidan aktivitesi ile düşürmüş olabileceği gibi, dolaylı olarak antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek düşürmüş olabilir. Zeytinyağı bileşimindeki hidroksitirosol ile gece boyu işleme sokulan melanoma hücrelerinde UV-A tarafından meydana getirilen hücre içi ROT düzeyinde de önemli bir düşüş belirlenmiştir (D'Angelo ve diğ., 2005). HepG2 hücreleri üzerinde hidroksitirosolün (10- 40 μM), stres uygulanmamış hücrelerin hücre içi ROT miktarını azalttığı, t-BOOH ile meydana getirilen oksidatif stres altında ise ROT miktarını önemli miktarda düşürdüğü belirlenmiştir (Goya ve diğ., 2007). İnsan monositik THP-1 hücreleri üzerinde 10 dakikalık hidroksitirosol (25-100 μM) uygulaması sonrası lipopolisakkarit ile stimüle edilmesi sonucu meydana gelen hücre içi oksidatif strese karşı, ROT miktarını $\sim\%$ 35 azaltarak ve GSH miktarını ise kontrole göre de daha yüksek miktarlara çıkmasını sağlayarak koruyucu etki göstermiştir (Zhang ve diğ., 2009). İnsan cilt keratinosit hücrelerinde UV-B sonrası 20 dakikalık hidroksitirosol (100 μM) uygulaması UV-B indüksiyonu ile artan hücre içi ROT miktarını etkin bir şekilde azaltmıştır (Guo ve diğ., 2010). Bu çalışmada ZFF'nun hücre içi ROT miktarını azaltıcı etkisi ilk olarak belirlenmiş olup, zeytinyağının fenolik fraksiyonu içinde bulunan hidroksitirosol'ün de benzer etkileri olduğu yukarıda bahsedilen çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen QPCR analizleri sonucunda HeLa hücrelerine 750 μM H_2O_2 uygulamasının mtDNA'da nDNA'nın ~ 2 katı hasar meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, mtDNA'daki okside baz miktarının nDNA'dan 2-3 kat fazla bulunması ve mtDNA'nın oksidatif hasara daha duyarlı olması ile açıklanabilir (Yakes ve van Houten, 1997; Hudson ve diğ., 1998). mtDNA'nın nDNA'ya göre oksidatif hasara daha açık olmasının birçok nedeni vardır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kompleks I ve III aktivitesi ile doğrudan hücre içindeki toplam oksijenin yaklaşık % 1-5'ini O_2^{\bullet} 'a dönüştürür (Turrens, 1997). Ayrıca ETZ proteinlerinin demir/bakır merkezlere sahip olması H_2O_2 'in geçiş metalleri ile Fenton reaksiyonu sonucunda meydana getirdiği OH^{\bullet} miktarını artırır (Salazar ve van Houten, 1997). Sonuç olarak mtDNA, mitokondriyal iç zarla ilişkili yerleşim gösterdiğinden, demir/bakır merkezlere sahip ETZ proteinlerine dolayısıyla ROT oluşum merkezlerine yakın konumlandığından oksidatif saldırıya daha açıktır (Ballinger ve diğ., 1999; Maynard ve diğ. 2009). Ayrıca

iç zar ile yakın ilişkisi, lipid peroksidasyon ürünlerinin de hedefi olmasına yol açabilir. Bu çalışmada, stresten önce ZFF uygulaması, mtDNA'da H₂O₂ tarafından meydana gelen hasarı önlemede yetersiz kalmıştır. Bu da mtDNA'nın daha fazla oksidana daha uzun süre maruz kalmasıyla açıklanabilir. nDNA ise ROT kaynaklarından uzakta konumlanması ve nukleusta daha az miktarda kısmen indirgenmiş metal bulunmasından dolayı H₂O₂'ten daha az etkilenir (Maynard ve diğ. 2009). Bu çalışmada mtDNA ile nDNA arasında oksidatif hasar bakımından belirlenen farklılık birçok çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Transforme insan fibroblast SV-40 hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonucunda (10 kb'lık dizide) mtDNA'da 2.25, β-globin gen kümesinde 0.436, HPRT gen bölgesinde 0.442 ve DNA polimeβagen bölgesinde 0.310 hasar olduğu görülmüştür (Salazar ve van Houten, 1997). İnsan kordan ven endotel hücreleri (HUVEC) ve aort düz kas hücreleri (HASMC) üzerinde H₂O₂ uygulamasının mtDNA'da [2.59 (HUVEC), 1.68 (HASMC) hasar/ 10kb] nDNA'ya [1.02 (HUVEC), -0.09 (HASMC) hasar/10 kb] göre daha yüksek miktarda hasar oluşturduğu belirlenmiştir (Ballinger ve diğ., 2000). İnsan spermatozoa hücrelerinde HPRT gen bölgesinde sadece 5 mM H₂O₂ uygulaması sonucunda (0.07 hasar/10 kb) hasar meydana gelirken, mtDNA'da (0.25 mM: 0.62; 1 mM: 1.34; 5 mM: 1.42 hasar/10 kb) çok daha fazla hasar oluşmuştur (Bennetts ve Aitken, 2005). Sperm hücreleri üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada da 300 μM H₂O₂ uygulaması sonucunda 10 kb'lık dizide mtDNA'da 1.32 ve nDNA'da (β-globin gen kümesinde) 0.47 hasar meydana geldiği belirlenmiştir (Bennetts ve diğ., 2008).

nDNA'da transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif bölgeler arasında strese duyarlılık bakımından bir fark olup olmadığını belirlemek üzere seçtiğimiz iki gen dizisi (aktif APEX geni ile inaktif β-globin gen kümesi) için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. H₂O₂ uygulaması APEX geninde 10 kb'lık dizi başına ~1.6 hasara, β-globin gen kümesinde ~1.5 hasara yol açmıştır. Bu bulgular, daha önce transforme insan fibroblast hücrelerinde (Salazar ve van Houten, 1997) ve insan sperm hücrelerinde (Sawyer ve diğ., 2003) elde edilmiş sonuçlarla uyumludur.

Zeytinyağı ve çeşitli bileşenlerinin DNA hasarını önleyici etkileri farklı hücre kültürü sistemlerinde gösterilmiştir. Hidroksitrosolün, nöronal hibridoma hücre hattında ONOO⁻ kaynaklı sekiz okside DNA baz ürününün miktarını azalttığı belirlenmiştir (Deiana ve

diğ., 1999). Tirosol, hidroksitirosol, kaffeik asit ve zeytinyağının total fenolik fraksiyonu ile ön uygulama yapılan insan T-lenfotik ve prostat kanser hücre hatlarında H₂O₂ uygulanması ile oluşan DNA hasarlarında azalma olmuştur (Quiles ve diğ., 2002a; Nouis ve diğ., 2005). İnsan keratinosit deri hücresi hattına (HaCaT) 20 dakikalık hidroksitirosol uygulaması, UV-B'nin neden olduğu 8-OHdG ve DNA'daki zincir kırıkları üzerinde engelleyici etki göstermiştir (Guo ve diğ., 2010).

Hayvanlar üzerinde yürütülen çalışmalar da vardır. Fareler üzerinde gerçekleştirilen az sayıdaki çalışmada, deri üzerine uygulanan zeytinyağının UV etkisiyle oluşan DNA hasarlarını azalttığı gösterilmiştir (Budiyanto ve diğ., 2000; Ichihashi ve diğ., 2000). Doksorubisinin sıçanlarda neden olduğu kromozom aberasyonlarının zeytinyağı ile beslenme sonucunda azaldığı görülmüştür (Antunes ve Takahashi, 1999). Ancak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada zeytinyağı ile beslenmenin karaciğerdeki etheno-DNA hasarları üzerine koruyucu bir etki göstermediği belirlenmiştir (Eder ve diğ., 2006).

Konuya ilişkin, insanlarda yapılan çalışmalar zeytinyağının gıda olarak tüketimini temel almaktadır. Örneğin, fenolikçe zengin zeytinyağı tüketiminin üriner atıktaki 8-OHdG miktarını azalttığı bildirilmektedir (Weinbrenner ve diğ., 2004). Menapoz sonrası dönemdeki 10 sağlıklı kadın üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada, zeytinyağı tüketiminin (fenolik içeriği ile doğru orantılı olarak) periferik kan hücrelerinde okside DNA bazlarının ve DNA'daki zincir kırıklarının temel düzeyini düşürerek oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Salvini ve diğ., 2006). Üçyüzkırkdört kişi üzerinde yapılan bir çalışmada, 3 haftalık zeytinyağı tüketimi sonucunda (düşük, orta ve yüksek fenolik içeriğe sahip olmasının bir etkisi olmaksızın) DNA'nın oksidasyon oranının düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, Kuzey Avrupalı bireylerde Merkez ve Güney Avrupalı bireylere göre DNA ve RNA oksidasyonunun daha yüksek oranda gerçekleştiği öne sürülmektedir. Bu farklılığın bölgeler arasındaki zeytinyağı tüketim miktarı ile ilişkili olduğu ve bazı kanser türlerinin görülme sıklığındaki farklılığı açıklayabileceği belirtilmiştir (Machowitz ve diğ., 2007). Bu 3 çalışmanın aksine 28 sağlıklı kişi üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, 3 haftalık zeytinyağı tüketimi sonucunda, üriner atıktaki etheno-DNA

hasarlarının miktarında önemli bir değişim olmadığı kaydedilmiştir (Hillestorm ve diğ., 2006).

HeLa hücreleriyle yürütülen bu tez çalışmasında oksidatif stres öncesi ZFF ile ön uygulama yapılmasının transkripsiyonel olarak aktif olan APEX genine ait dizide ve transkripsiyonel olarak inaktif olan β -globin gen kümesine ait dizide hasar oluşumunu tamamen engellediği, GA ile yapılan ön uygulamanın ise hasar oluşumunu önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. ZFF'nin oksidatif DNA hasarını önleyici etkisi, doğrudan antioksidan aktivitesi veya dolaylı olarak antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek düşürmüş düşürmüş olabileceği gibi, hücre içi ROT düzeyini olabilir. H_2O_2 'in neden olduğu oksidatif DNA hasarını engellemede ZFF'nun GA'ten daha etkin olması, fenolik fraksiyonun farklı süpürücü aktivitelere sahip karışık bir bileşime sahip olmasından kaynaklanmaktadır. ZFF stres sonucu oluşan hücre içi ROT miktarını hücrenin normal şartlardaki ROT miktarının da altına düşürmüştür. Benzer bir bulgu Goya ve diğ., (2007) tarafından da HepG2 hücrelerinde hidroksitirozol için bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda, ZFF'nun mutajenik ve kanserojenik olduğu belirlenmiş olan (Salles ve diğ., 1999; Loeb ve Loeb, 2000; Marnett, 2000; Dizdaroğlu ve diğ., 2002; de Souza-Pinto ve diğ., 2008) oksidatif DNA hasarlarını nDNA'da tamamen engellediği ortaya konulmuştur.

H_2O_2 oldukça düşük derişimlerde sinyal yollarında önemli roller üstlenir (Finkel, 1998; Hancock ve diğ., 2001). Bununla beraber yüksek derişimlerde oksidatif stres meydana getirerek HeLa hücrelerinde mitokondri bağımlı iç yolak aracılığı ile apoptozu teşvik eder (Singh ve diğ., 2007). Hücrenin oksidatif strese cevabı, oluşan DNA hasarının onarımı, onarım için zaman kazandıran hücre döngüsünde gecikme ve onarılamayan hasarlar sonucunda apoptoz şeklinde gelişir (Maynard ve diğ., 2009). Jurkat T hücrelerinde 6 saatlik H_2O_2 uygulamasının DNA'da meydana getirdiği zincir kırıkları sonucunda hücre döngüsündeki aksamalardan dolayı apoptotik hücre ölümünü teşvik etmiş olabileceği öne sürülmektedir (Barbouti ve diğ., 2002). Yakes ve van Houten (1997) tarafından yapılan bir çalışmada ise mtDNA'da onarılamayan hasarların apoptotik hücre ölümüne neden olabileceği bildirilmiştir. Retinal pigment epitelyum

hücrelerinde H_2O_2 uygulamasının mtDNA hasarına ve apoptotik hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (Jin ve diğ., 2001). Apoptotik hücre ölümünün belirteçlerinden biri, iç yolakta görevli başlatıcı enzim kaspaz 9'dur (Nunez ve diğ., 1998). Bu çalışmada incelenen deney gruplarında, oksidatif stres ve antioksidan korumanın apoptozla ilişkisini ortaya koymak üzere kaspaz 9 aktivitesi ölçülmüştür. HeLa hücrelerinde kaspaz 9 aktivitesinin H_2O_2 (1 saat, 750 μ M) uygulaması ile ~2.2 kat arttığı belirlenmiştir. ZFF ile 4 saatlik ön uygulama bu artışı tamamen önlerken, GA önemli miktarda düşmesini sağlamıştır. Dolayısıyla ZFF'nin anti-apoptotik aktivitesi insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin bir nedeni olabilir. Bu etki antioksidan savunma sistemine ROT düzeyini düşürerek yaptığı katkıdan, nDNA'daki hasarları önleyici etkisinden veya başka etki mekanizmalarından kaynaklanıyor olabilir.

H_2O_2 'in, özellikle ETZ proteinlerinin demir/bakır merkezleri ile reaksiyonu sonucunda, bu enzimler inaktive olabilir. Bu olay, elektron taşınımının inaktivasyonuna neden olduğu gibi, hasar görmüş proteinlerin elektronlarını alan oksijenin yüksek miktarda $O_2^{\cdot-}$ oluşturmaya da neden olur (Salazar ve van Houten, 1997). Çalışmamızda uygulanan maddelerin sitotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılan MTT analizi, ETZ'nin II. kompleksi olan süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi aracılığıyla gerçekleştirilir (Yakes ve van Houten, 1997; Ballinger ve diğ., 1999). Süksinat dehidrogenaz aktivitesi mitokondriyal redoks fonksiyonunun bir belirteçidir. Hücrenin solunum ve redoks fonksiyonunu veya canlılığını belirlemek için sıkça kullanılır (Huet ve diğ., 1992; Ballinger ve diğ., 1999). Sitokrom oksidaz enzim aktivitesindeki azalmanın da mtDNA'da meydana gelen moleküler değişimlerle (oksidatif hasar, mutasyon, delesyon) ilişkili olduğu bilinmektedir (Müller-Höcker ve diğ., 1993). Ballinger ve diğ. (2000) tarafından HUVEC ve HASMC üzerinde H_2O_2 uygulamasının meydana getirdiği DNA hasarı ile hücrelerin fonksiyon kaybı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada; mtDNA'da nDNA'dan daha fazla hasar olduğu görülmüş ve kompleks II aktivitesinin ve hücre ATP düzeylerinin önemli miktarda azalması aracılığıyla mitokondriyal fonksiyonun kaybedildiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile uygulanan H_2O_2 derişimleri arasında ters bir orantı olduğu ve 500 μ M H_2O_2 ile 1 saatlik uygulama sonunda süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin ~% 42 azaldığı belirlenmiştir. Sitokrom oksidaz enzim aktivitesinin ise 5 saatlik inkübasyondan sonra ~% 44 azaldığı ve ZFF veya GA ile ön

uygulama yapılmasının bu enzimin aktivitesi üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Sitokrom oksidaz enzim aktivitesinde belirlenen azalma bu enzimin katalitik alt birimlerine ait dizileri içeren mtDNA'da QPCR analizi ile belirlenen hasar ile uyumludur. Yaşlanma ile birlikte mtDNA'da biriken hasarların bir sonucu olarak ETZ'deki enzimlerin aktivitesinde gözlenen azalma ve buna bağlı olarak mitokondriyal fonksiyon kayıpları daha önce birçok çalışma ile belirlenmiştir (Hudson ve diğ., 1998; Ballinger ve diğ., 2000).

Sonuç olarak, bu çalışmada HeLa hücrelerinde 4 saatlik ZFF ön uygulamasının;

1. Normal fizyolojik koşullar altında, hücre içi ROT miktarını belirgin düzeyde azalttığı,
2. H₂O₂'in meydana getirdiği oksidatif stres koşulunda, hücre içi ROT miktarının normal düzeyinde kalmasını sağladığı,
3. nDNA'yı H₂O₂'in neden olduğu oksidatif DNA hasarlarına karşı tamamen koruduğu,
4. Normal koşullarda, bazı fizyolojik süreçler ile teşvik edilen apoptotik ölüm oranını anlamlı düzeyde düşürdüğü,
5. H₂O₂'in iç yolak aracılığıyla teşvik ettiği apoptotik hücre ölümüne karşı ise tamamen koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

ZFF'nun oksidatif strese karşı koruyucu etkisini hücre içi ROT miktarını azaltarak, nDNA'yı oksidatif hasardan koruyarak ve oksidatif stresin bir sonucu olan apoptotik hücre ölümünü önleyerek gösterdiği ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın devamında, ZFF'nun nDNA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkisi (katalaz, glutatyon, BER-DNA onarım sistemi, vb.) belirlenmelidir. Aynı zamanda oksidatif stresin hasar verdiği diğer makromoleküller (lipid ve proteinler) üzerindeki etkisi de değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- ABALEA, V, CILLARD, J., DUBOS, M.P., SERGENT, O., CILLARD, P., MOREL, I., 1999, Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures, *Free Radical Bio. Med.*, 26 (11/12), 1457- 1466.
- ADAMS, M.W., JENNEY,E.F.JR., CLAY, M.D., JOHNSON M.K., 2002, Superoxide reductase: fact or fiction?, *J. Biol. Inorg. Chem.*,7 (6), 647–652.
- AEBI, H. (1974) Catalase. Bergmeyer, H. U. eds. *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd ed. 1974:673- 684 Verlag Chemie Weinheim, Germany.
- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARREL, B.G., DE BRUIN, M.H.L., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A. SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J.H., STADEN, R., YOUNG, I.G., 1981, Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457- 465.
- ANTUNES, F., CADENAS, E., 2000, Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes, *Febs. Lett.*, 475, 121- 126.
- ANTUNES, L.M.G., TAKAHASHI, C.S., 1999, Olive oil protects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in Wistar rat bone marrow cells, *Genet. Mol. Biol.*, 22 (2), 225- 227.
- AW, T.Y., Determinants of intestinal detoxification of lipid hydroperoxides, *Free Radical Res.*, 1998; 28 (6), 637–646.
- AYALA-TORRES, S., CHEN, Y., SVOBODA, T., ROSENBLATT, J., VAN HOUTEN, B., 2000, Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction, *Methods*, 22, 135-147.
- BABIOR, B.M., 2000, Phagocytes and oxidative stress, *Am. J. Med.*,109 (1), 33–44.
- BALLINGER, S.W., PATTERSON, C., YAN, C., DOAN, R., BUROW, D.L., YOUNG, C.G., YAKES, F.M., VAN HOUTEN, B., BALLINGER, C.A., FREEMAN, B.A., RUNGE, M.S., 2000, Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells, *Circ. Res.*, 86, 960-966.
- BALLINGER, S.W., VAN HOUTEN, B., JIN, G., CONKLIN, C.A., GODLEY, B., 1999, Hydrogen peroxide caused significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells, *Exp. Eye. Res.*, 68, 765-772.

- BARBOUTI, A., DOULIAS, P. T., NOUSIS, L., TENOPOULOU, M., GALARIS, D. 2002, DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂, *Free Radical Bio. Med.*, 33(5), 691-702.
- BARTSCH, H., NAIR, J., OWEN, R.W., Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants, *Biol. Chem.*, 383, 915- 921.
- BECKMAN, K.B., AMES, B.N., 1997, Oxidative decay of DNA, *J. Biol. Chem.*, 272 (32), 19633-19636.
- BENNETTS, L.E., AITKEN, J., 2005, A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa, *Mol. Reprod. Dev.*, 71, 77- 87.
- BENNETTS, L.E., DE LULIIS, G.N., NIXON, B., KIME, M., ZELSKI, K., MCVICAR, C.M., LEWIS, S.E., AITKEN, R.J., 2008, Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities, *Mutat. Res.*, 641, 1- 11.
- BIENERT, G.P., SCHJOERRING, J.K., JAHN, T.P., 2006, Membrane transport of hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1758, 994- 1003.
- BOHR, V.A. 2002, Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells, *Free Radical Bio. Med.*, 32 (9), 804- 812.
- BOHR, V.A., STEVENSNER, T., DE SOUZA-PINTO, N. C., 2002, Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells, *Gene*, 286, 127- 134.
- BOSKOU, D., 2000, Olive oil, *World Rev. Nutr. Diet.*, 87: 56- 77.
- BOUAZIZ, M., CHAMKHA, M., SAYADI, S., 2005, Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of olive cultivar Chemlali from Tunisia, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5476–5481.
- BUDIYANTO, A., AHMED, N.U., WU, A., BITO, T., NIKAIDO, O., OSAWA, T., UEDA, M., ICHIHASHI, M., 2000, Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UV-B exposure of mice, *Carcinogenesis*, 21 (11), 2085- 2090.
- BUKAU, B., HORWICH, A.L, 1998, The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351- 366.
- BURDON, R.H., GILL, V., BOYD, P.A., RAHIM, R.A., 1996, Hydrogen peroxide and sequence-specific DNA damage in human cells, *FEBS Lett.*, 383, 150- 154.
- BUTTERFIELD, L.H., MERINO, A., GOLUB, S.H., SHAU, H., 1999, From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox. Signal*, 1 (4), 385–402.

- CADENAS, E., 1989, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79-110.
- CAKIR, Y., YANG, Z., KNIGHT, C.A., POMPILIUS, M., WESTBROOK, D., BAILEY, S.M., PINKERTON, K.E., BALLINGER, S.W., 2007, Effect of alcohol and tobacco smoke on mtDNA damage and atherogenesis, *Free Radical Bio. Med.*, 43, 1279- 1288.
- CAPARASO, N., 2003, The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer, *J. Natl. Cancer Ins.*, 95 (17), 1263- 1265.
- CARR, A.C., WINTERBOURN, C.C., 1997, Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 327 (1), 275–281.
- CARRASCO, P.A., CRUCES-BLANCO, C., SERUGA-CARRETERO, FRENANDEZ-GUTIEREZ, A., 2004, Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electroforesis, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6687- 6693.
- CHAE, H.Z., KANG, S.W., RHEE, S.G., 1999, Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.*, 300, 219-226.
- CHEN, J.J., BERTRAND, H., YU, B.P., Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products, *Free Radical Bio. Med.*, 1995; 19 (5)583–590.
- CHRISTMANN, M., TOMICIC, M.T., ROSS, W.P., KAINA, B., 2003, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology*, 193, 3- 34.
- COLLINS, A.R., HORVATHOVA, E., 2001, Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay, *Biochem. Soc. Trans.*, 337- 341.
- COOKE M.S., EVANS M.D., DIZDAROĞLU M., LUNEC J., 2003, Oxidative DNA Damage: Mechanisms, *Mutation and Disease*, 17, 1195- 1214.
- COOKE, M.S., ROZALSKI, R., DOVE, R., GACKOWSKI, D., SIOMEK, A., EVANS M.D., OLINSKI. R., 2006, Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patient. *Biol. Chem.*, 387, 393- 400.
- COVAS, M.I., NYSSÖNEN, K., POULSEN, H.E., KAIKKONEN, J., ZUNFT, H.J.F., KEISEWETTER, H., GADDI, A., TORRE, R., MURSU, J., BAUMLER, H., NASCETTI, S., SALONEN, J.T., FITO, M., VIRTANEN, J., MARRYGAT, J., 2006a, The effect of polyphenols olive oil on heart disease risk factors, *Ann. Intern. Med.*, 145, 333- 341.
- COVAS, M.I., TORRE, K., FARRE-ALBALADEJO, M., KAIKKONEN, J., FITO, M., LOPEZ- SABATER, C., 2006b, Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in human, *Free Radical Bio. Med.*, 40, 608- 619.

- CROTEAU, D.L., BOHR, V.A., 1997, Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 272 (41), 25409- 25412.
- CUMMING, R.C., ANDON, N.L., HAYNES, P.A., PARK, M., FISCHER, W.H., SCHUBERT, D., 2004, Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 279, 21749- 21758.
- D'ANGELO, S., INGROSSO, D., MIGLIARDI, V., SORRENTINO, A., DONNARUMMA, G., BARONI, A., MASELLA, L., TUFANO, M.A., ZAPPIA, M., GALLETTI, P., 2005, Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells, *Free Radical Bio. Med.*, 38, 908- 919.
- DAROUI, P., DESAI, S.D., LI, T.K., LIU, A.A., LIU, L.F., 2004, Hydrogen peroxide induces Topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death, *J. Biol. Chem.*, 279 (15), 14587- 14594.
- DE SOUZA-PINTO, N.C., WILSON III, D.M., STEVENSNER, T.V., BOHR, V.A., 2008, Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration, *DNA repair*, 7, 1098- 1109.
- DENG, G., SU, J. H., IVINS, K.J., VAN HOUTEN, B., COTMAN, C.W. 1999, Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress, *Exp. Neurol.*, 159, 309- 318.
- DENISSENKO, M.F., CAHILL, J., KOUDRIAKOVA, T.B., GERBER, N., PFEIFER, G.P., 1999, Quantitation and mapping of aflatoxin b1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin b1-8,9-exposed and microsomal activation systems, *Mutat. Res.*, 425, 205- 211.
- DI BENEDETTO, R., VARI, R., SCAZZOCCHIO, B., FILESI, C., SANTANGELO, C., GIOVANNINI, C., MATERRESE, P., D'ARCHIVIO, M., MASELLA, R., 2007, Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness, *Nutr. Metab. Cardiovas.*, 17, 535- 545.
- DIANOV, G., BISCHOFF, C., PIATROVSKI, J., BOHR, V.A., 1998, Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts, *J. Biol. Chem.*, 273, 33811- 33816.
- DIEANA, M., ARUMO, O.I., BIANCHI, M.L.P., SPENCER, J.P.E., KAUR, H., HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., BANNI, S., DESSI, M.A., CORONGIU, F.P., 1999, Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol, *Free Radical Bio. Med.*, 26 (5/6), 762- 769.
- DIZDAROĞLU, M., 1993, Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS*, 315 (1), 1- 6.

- DIZDAROĞLU, M., JARUGA, P., BIRINCIOĞLU, M., RODRIGUEZ, H., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radical Bio. Med.*, 32 (11), 1102- 1115.
- DUTHIE, S.J., JOHNSON, W., DOBSON, V.L., 1997, The effect of dietary flavonoids on DNA damage strand breaks and oxidised and growth in human cells, *Mutat. Res.*, 390, 141- 151.
- EDER, E., WACKER, M., LUTZ, U., NAIR, J., FANG, X., BARTSCH, H., BELAND, F.A., SCHLATTER, J., LUTZ, W.K., 2006, Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets, *Chem. Biol. Interact.*, 159, 81- 89.
- EFSTRATIADIS, A., POSAKONY, J.W., MANIATIS, T., LAWN, R.M., O'CONNELL, C., SPRITZ, R.A., DERIEL, J.K., FORGET, B.G., WEISSMAN, S.M., SLIGHTOM, J.L., BLECHL, A.E., SMITHIES, O., BARALLE, F.E., SHOULDERS, C.C., PROUDFOOT, N.J., 1980, The structure and evolution of the human beta-globin gene family, *Cell*, 21 (3) 653- 668.
- ELCHURI, S., OBERLEY, T.D., QI, W., EISENSTEIN, R.S., ROBERTS, L.J., VAN REMMEN, H., EPSTEIN, C.J., HUANG, T.T., 2005, Cu,Zn-SOD deficiency leads to persistent and wide-spread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life, *Oncogene*, 24, 367- 380.
- ELLIOT, R.M., ASTLEY, S.B., SOUTHON, S., ARCHER, D.B. 2000, Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage, *Free Radical Bio. Med.*, 28 (9), 1438- 1446.
- ERNSTER, L., FORSMARK, P., NORDENBRAND, K., 1992, The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, *Biofactors*, 3 (4), 241-248.
- EVANS, A.R., LIMP-FOSTER, M., KELLEY, M.R., 2000, Going APE over Ref-1, *Mutat. Res.*, 461, 83- 108.
- FABIANI, R., ROSIGLONI, P., DE BARTOLOMEO, A., FUCCELLI, R., SERVILI, M., MONTODERO, G.F., MOROZZI, G., 2008, Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells, *J. Nutr.*, 138, 1411- 1416.
- FAGLIANO, V., RITIENI, A., MONTI, S.M., GALLO, M., MEDEGLIA, D.D., AMBROSSI, M.L., SACCHI, R., 1999, Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system, *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1803- 1808.
- FAN, Z., BERESFORD, P.J., ZHANG, D., XU, Z., NAVINA, C.D., YOSHIDA, A., POMMIER, Y., LIEBERMAN, J., 2003, Cleaving the oxidative repair protein APE1 enhanced cell death mediated by granzyme A, *Nat. Immun.*, 4 (2), 145- 153.

- FINKEL, T., 1998, Oxygen radicals and signaling, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10, 248- 253.
- FISCHER, U., SCHULZE-OSTOFF, K., 2005, Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infect. Immun.*, 73 (4), 1907- 1916.
- FITO, M., COVAS, M.I., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., NILA, J., TORRENTS, J., TORRE, C., MARRUGAT, J., 2000, Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation, *Lipids*, 35, 633- 638.
- FORSTROM, J.W., STULTS, F.H., TAPPEL, A.L., 1979, Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 193 (1), 51-55.
- FREI B, KIM C.M., AMES N.B., 1990, Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (12), 4879- 4883.
- FRESHNEY, R.I., 2000. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*, 4th ed., Wiley-Liss press., UK.
- FRIDOVICH, I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- FRIDOVICH, I., 1997, Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (30), 18515- 18517.
- FRITZ, G., 2000, Human APE/Ref-1 protein, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32, 925- 929.
- FRITZ, G., GRÖSCH, S., TOMICIC, M., KAINA, B., 2003, APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress, *Toxicology*, 193, 67- 78.
- FROSINA, G., 2000, Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA, *Eur. J. Biochem.*, 267, 2135- 2149.
- FROSSI, B., TELL, G., SPESSOTTO, P., COLOMBATTI, A., VITALE, G., PUCILLO, C., 2002, H_2O_2 induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in Raji B-cell line, *J. Cell. Physiol.*, 193, 180- 186.
- GARCIA-ALANSO, F.J., GUIDARELLI, A., PERIAGO, M.J., 2007, Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation, *J. Nutr. Biochem.*, 18, 457- 466.
- GIMENO, E., TORRE-CARBOT, K., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., CASTELLOTE, A.I., FITO, M., TORRE, R., COVAS, M.I., LOPEZ-SABATER, M.C., 2007, Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men: a randomized crossover controlled trial, *Brit. J. Nutr.*, 98, 1243- 1250.

- GOTHEL, S.F., MARAHIEL, M.A., 1999, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts, *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 423- 36.
- GOVAN, H.L., VALLES-AYOUB, Y., BRAUN, J., 1990, Fine-mapping of DNA damage and repair in specific, *Nucleic Acids Res.*, 18 (13) , 3823- 3830.
- GOYA, L., MATEOS, R., BRAVO, L., 2007, Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells, *Eur. J. Nutr.*, 46, 70- 78.
- GRIMALDI, K.A., BINGHAM, J.P., SOUHAMI, R.L., HARTLEY J.A., 1994, DNA damage by anticancer agents and its repair: mapping in cells at the subgene level with quantitative polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.*, 222, 236- 242.
- GRIMALDI, K.A., MCGURK, C.J., MCHUGH, P.J., HARTLEY, J.A., 2002, PCR-based methods for detecting DNA damage and its repair at the sub-gene and single nucleotide levels in cells, *Mol. Biotechnol.*, 20, 181- 196.
- GROS, L., ISHCHEKOV, A.A., SAPARBAEV, M., 2003, Enzymology of repair of etheno-adducts, *Mutat. Res.*, 531, 219- 168.
- GUO, W., AN, Y., JIANG, L., GENG, C., ZHONG, L., 2010, The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in hacaat cells, *Phytother. Res.*, 24, 352- 359.
- HALLIWELL B. 1996, Antioxidants in human health and disease, *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 33–50.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE J.M.C., 2003, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed: Oxford University Press.
- HALLIWELL, B., 1997, Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.*, 55, 44–49.
- HALLIWELL, B., 1999, Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res.*, 31 (4), 261–272.
- HALLIWELL, B., 2002, Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?, *Free Radical Bio. Med.*, 32 (10), 968- 974.
- HANCOCK, J.T., DESIKA, R., NEILL, S.J., 2001, Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways, *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 345- 350.
- HENLE, E.S., LINN, S., 1997, Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/ hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 272 (31), 19095–19098.
- HILLESTORM, P.R., COVAS, M.I., POULSEN, H.E., 2006, Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno-DNA adducts, *Free Radical Bio. Med.*, 41, 1133- 1138.
- HOIDAL, J.R., 2001, Reactive oxygen species and cell signaling, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 25, 661- 663.

- HU, W., KAVANAGH, J.J., 2003, Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway, *Lancet Oncol.*, 4, 721- 729.
- HUDSON, E.K., HOUGE, B., DE SOUZA-PINTO, N., CROTEAU, D.L., ANSON, R.M., BOHR, V.A., HANSFORD, G., 1998, Age-associated change in mitochondrial DNA damage, *Free Radical Res.*, 29, 573- 579.
- HUERTAS, J.R., MARTINEZ-VELASCO, E., IBANEZ, S., LOPEZ-FRIAS, M., OCHOA, J.J., QUILES, J., PARENTI, C.G., MATAIX, J., LENAIZ, G., 1999, virgin olive oil and coenzyme Q10 protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging, *Biofactors*, 9 (2- 4), 337-343.
- HUET, O., PETIT, J.M., RATINAUD, M.H., JULIEN, R., 1992, NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by structure and spectroscopy, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, 329-356.
- HUI-LIAN, W., QIAN-RONG, L., ZHAO-FENG, L., 2003, The Protective effect and mechanism of soyabean oil and its extract on DNA damage in human ECV304 cells exposed to UV-C, *Biochim. Biophys. Acta.*, 93778, 1-6.
- ICHIHASHI, M., AHMED, N.U., BUDIYANTO, A., WU, A., BITO, T., NIKAIDO, O., UEDA, M., OSAWA, T., 2000, Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice, *J. Dermatol. Sci.*, 23(1), 45-50.
- INOUE, M., SUZUKI, R., SAKAGUCHI, N., LI, Z., TAKEDA, T., OGIHARA, Y., JIANG, B.Y., CHEN, Y., 1995, Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1526- 1530.
- JARUGA, P., DIZDAROĞLU, M., 1996, Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells, *Nucleic Acids Res.*, 24 (8), 1389-1394.
- JEZEK, P., HLAVAT, L., 2005, Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 37 (12), 2478-2503.
- JIN, G.F., HURST, J.S., GODLEY, B.F., 2001, Hydrogen peroxide stimulates apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells, *Curr.Eye. Res.*, 22 (3), 165- 173
- JOENJE, H., PATEL, K.J., 2001, The emerging genetic and molecular basis of fankoni anemia, *Nutr. Rev. Genet.*, 2, 446- 457.
- JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., 1998, Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions, *Biochem. J.*, 335, 85- 94.
- JUNJI, K., 2006, History of HeLa cells. Birth of cell culture and women with dying-resistance, *Jpn. J. Hist. Biol.*, 76, 69- 72.
- KALINOVSKI, D.P., IILENYE, S., VAN HOUTEN, B., 1992, Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res.*, 20(13), 3485- 3494.

- KANE, C.M., LINN, S., 1981, Purification and characterization of an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, 256 (7), 3405- 3414.
- KEHRER, J.P., 2000, The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149 (1), 43–50.
- KING, C.C., JEFFERSON, M.M., THOMAS, E.L., 1997, Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils, *J. Leukocyte Biol.*, 61 (3), 293–302.
- KIRKMAN, H.N., GAETANI, G.F., 1984, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *PNAS*, 81 (14), 4343–4347.
- KLAUNIG, J.E., KAMENDULIS, L.M., 2004, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 239- 267.
- KOOIJ, A., 1994, A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase, *Histochem. J.*, 26 (12), 889-915.
- KOUKOURAKIS, M.I., GIATROMANOLAKI, A., KAKOLYRIS, S., SIVRIDIS, E., GEORGOULIAS, V., FUNTZILAS, G., HICKSON, I.D., GATTER, K.G., PHIL, D., HARRIS, A.L., PHIL, D., 2001, Nuclear expression of human apurinic/aprimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome, *Int. J. radiation oncologybiol. Phys.*, 50 (1), 27- 36.
- KOVALENKO, O.A., SANTOS, J.H., 2009, Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR, *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 62, 19.1.1- 19.1.13.
- LI, L., NG, T.B., LI, W., FU, M., NIU, S.M., ZHAO, L., CHEN, R.R., LIU, F., 2005, Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice, *Life Sci.*, 77, 230- 240.
- LI, M.Z., JIN, Z.C., CHEN, W.Y., LI, H.J., 2004, DNA repair of CHL cells and HeLa cells after DNA damage induced by different oxidative agents, *Nat. Med.*, 33 (3), 235- 238.
- LI, X.G., LIU, D.P., LIANG, C.C., 2001, Beyond the locus control region: new light on β -globin locus regulation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33: 914-923.
- LIMA, C.F., FEMANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C., 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels, *Life Sci.*, 79 (21), 2056- 2068.
- LINTON, S., DAVIES, M.J., DEAN, R.T., 2001, Protein oxidation and ageing, *Exp. Gerontol.*, 36 (9), 1503–1518.
- LIU, R.H., SUN, J., 2003, Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1718- 1723.

- LIU, S., HOU, W., YAO, P., ZHANG, B., SUN, S., NUSSLER, A.K., LIU, L., 2010, Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes, *Toxicol. In Vitro*, 24, 516- 522.
- LOEB, K.R., LOEB, L.A., 2000, Significance of multiple mutations in cancer, *Carcinogenesis*, 21 (3), 379- 385.
- MACHOWETZ, A., POULSEN, H.E., GRUENDEL, S., WIEMANN, A., FITO, M., MARRUGAT, J., TORRE, R., SALONEN, J.T., NYSSONEN, K., MURSU, J., NASCETTI, S., GADDI, A., KIESEWETTER, H., BAUMLER, H., SELMI, H., KAIKKONEN, J., ZUNFT, H.J.F., COVAS, M.I., KOEBNICK, C., 2007, Effect of olive oil on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans, *FASEB J.*, 21, 45- 52.
- MACVILLE, M., SCHRÖCK, E., PADILLA-NASH, H., KECK, C., GHADIMI, B.M., ZIMONJIC, D., POPESCU, N., RIED, T., 1999, Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.*, 59, 141- 150.
- MANDAVILLI, B.S., SANTOS, J.H., VAN HOUTEN, B., 2002, Mitochondrial DNA repair and aging, *Mutat. Res.*, 509, 127- 151.
- MANIATIS, T., FRITCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Cold Spring Harbor.
- MANNA, C., GALETTI, P., CUCCIOLLA, V., MOLTEDO, O., LEONE, A., ZAPPIA, V., 1997, The protective effect of olive oil polyphenol 3,4-dihydroxyphenyl - ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells, *J. Nutr.*, 127, 286-292.
- MARNETT, L.J., 2000, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21 (3), 361- 370.
- MARRUGAT, J., COVAS, M.I., FITO, M., SCHRODER, H., MIRO-CASAS, E., GIMENO, E., LOPEZ-SABATER, M.C., TORRE, R., FARRE, M., 2004, Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation-a randomized controlled trial, *Eur. J. Nutr.*, 43, 140- 147.
- MARTIN, M.A., RAMOS, S., MATEOS, R., SERRANO, A.B.G., IZQUIERDO-PULIDO, M., BRAVO, L., GOYA, L., 2008, Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7765- 7772.
- MAYNARD, S., SCHURMAN, S.H., HARBOE, C., DE SOUZA-PINTO, N.C., BOHR, V.A., 2009, Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging, *Carcinogenesis*, 30 (1), 2- 10.
- MCCARTHY, M.J., ROSENBLATT, J.I., LLOYD, R.S., 1996, A modified quantitative polymerase chain reaction assay for measuring gene-specific repair of UV photoproducts in human cells, *Mutat. Res.*, 363, 57-66.

- MICHEL, H., BEHR, J., HARRENGA, A., KANNT, A., 1998, Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, 329- 356.
- MOAT, A.G., 1979, *Microbial Physiology*, John Wiley and Sons, New York, 0-471-07258-3.
- MOHR, D., BOWRY, V.W., STOCKER, R., 1992, Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance to human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochi. Biophys. Acta*, 1126 (3), 247-254.
- MOSMANN, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods*, 65 (1–2), 55- 63.
- MULLER-HOCKER, J., SEIBEL, P., SCHNEIDERBANGER, K., KADENBACH, B., 1993, Different in situ hybridization patterns of mitochondrial DNA in Cytochrome *c* oxidase-deficient extraocular muscle fibres in the elderly, *Virchows Archiv. A Pathol. Anat.*, 422, 7- 15.
- NAKAGAWA, Y., MOLDEUS, P., MOORE, G., 1997, Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes, *Arch. Toxicol*, 72, 33- 37.
- National Center for Biotechnology Information, Primer-BLAST [online] NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tool/primer-blast/> [Ziyaret Tarihi: 5 Kasım 2006].
- NEGRE-SALVAYRE, A., AUGÉ, N., DUVAL, C., ROBBESYN, F., THIERS, J.C., NAZZAL, D., BENOIST, H., SALVAYRE, R., 2002, Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes, *Methods Enzymol.*, 352,62-71.
- NEKHAEVA, E., BOYDAK, N.D., KRAYTSBERG, Y., MCGRATH, S.B., VAN ORSOUW, N.J., PLUZHNIKOV, A., WEI, J.Y., VIJG, J., KHRAPKO, K., 2002, Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues, *PNAS*, 99 (8), 5521- 5526.
- NENADIS, N., TSIMIDOU, M., 2002, Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 257-259.
- NOUSIS, L., DOULIAS P. T., ALIGIANNIS, N., BAZIOS, D., AGALIAS, A., GALARIS, D., MITAKOU, S., 2005, DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free radical Res.*, 39 (7), 787- 795.
- NUNEZ G., BENEDICT, M.A., HU, Y., INOHARA, N., 1998, Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene*, 17, 3237- 3245.
- OWEN, R.W., MIER, W., GIACOSA, A., HULL, W.E., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H., 2000, Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil, *Clin. Chem.*, 46, 976- 988.

- PALSTRA, R.J., TOLHUIS, B., SPLINTER, E., NIJMEIJER, R., GROSVELD, F., DE LAAT, W., 2003, The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation, *Nat. Genet.*, 35 (2) 190- 194.
- PAPADOPOULOS, N., NICOLAIDES, N.C., WEI, Y.F., RUBEN, S.M., CARTER, K.C., ROSEN, C.A., HASETLINE, W.A., FLEISDHMANN, R.D., FRASER, C.M., ADAMS, M.D., 1994, Mutation of a Mut-1 homolog in hereditary colon cancer, *Science*, 263, 1625- 1629.
- PARK J.W., FLOYD, R.A., 1997, Glutathione / Fe³⁺ / O²-mediated DNA strand breaks and 8-hydroxydeoxyguanosine formation-Enhancement by copper, zinc superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336 (2), 263–268.
- PARK, S.Y., SHIN, S.W., LEE, S.M., PARK, J.W., 2008, Hypochlorous acid-induced modulation of cellular redox status in HeLa cells, *Arch. Pharm. Res.*, 31 (7), 905-910.
- PICK, E., Y. KEISARI, A., 1980, Simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods*, 38 (1-2), 161-70.
- PUERTA, R., DOMINGUEZ, M.E.M., RUIZ-GUITIERREZ, V., FLAVILL, J.A., HOULT R.S., 2001, Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission, *Life Sci.*, 69, 1213-1222.
- QUILES, J. L., FARQUHARSON, A. J., SIMPSON, D. K., GRANT, I., WAHLE, K. W. J., 2002a, Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells, *Br. J. Nutr.*, 88, 225-234.
- QUILES, J.L., HUERTAS, J.R., BATTINO, M., MATAIX, J., RAMIREZ-TORTOSA, M.C., 2002b, Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity, *Toxicology*, 180, 79-95.
- RAGAZZI, E., VERONESE, G., 1973, Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation, *J. chromatogr.*, 77, 369-375.
- RAMANA, C.V., BOLDOGH, I., IZUMI, T., MITRA, S., 1998, Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals, *PNAS.*, 95, 5061- 5066.
- RAO, C.V., NEWMARK, H.L., REDY, B.S., 1998, Chemopreventive effect of squalene on colon cancer, *Carcinogenesis*, 19 (2), 287- 290.
- REED, J.C., 2000, Mechanisms of apoptosis, *Am. J. Pathol.*, 157, (5), 1415- 1430.
- RENZING, J., HANSEN, S., LANE, D.P., 1996, Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J. Cell Sci.*, 109, 1105- 1112.
- RONEN, A., GLICKMAN, B.W., 2001, Human DNA repair genes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 37, 241- 283.

- ROTONDI, A., BENDINI, A., CERRETANI, L., MARI, M., LERCKER, G., TOSCHI, T.G., 2004, Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. nostrana di brisighella extra virgin olive oil, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3649- 3654.
- SAKAGUCHI, N., INOUE, M., OGIHARA, Y., 1998, Reactive oxygen species and intracellular Ca^{2+} , common signals for apoptosis induced by gallic acid, *Biochem. Pharmacol.*, 55 (12), 1973- 1981.
- SALAZAR, J.J., VAN HOUTEN, B., 1997, Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts, *Mutat. Res.*, 385, 139- 149.
- SALLES, B., SATTLER, U., BOZZATO, C., CALSOU, P., 1999, Repair of oxidative DNA damage *in vitro*: a tool for screening antioxidative compounds, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1009- 1014.
- SALVINI, S., SERA, F., CARUSO, D., GIOVANNELLI, L., VISIOLI, F., SAIIEVA, C., MASALA, G., CEROTI, M., GIOVACCHINI, V., PITOZZI, V., GALLI, C., ROMANI, A., MULINACCI, N., BORTOLOMEAZZI, R., DOLARA, P., PALLI, D., 2006, Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women, *Br. J. Nutr.*, 95, 742- 751.
- SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L.A., UNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S., 2004, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 39- 85.
- SANTOS, J.H., HUNAKOVA, L., CHEN, Y., BORTNER, C., VAN HOUTEN, B., 2003, Cell shorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.*, 278 (3), 1728- 1734.
- SAVITSKY, K., BAR-SHIRA, A., GILAD, S., ROTMAN, G., ZIV, Y., VANAGAITE, L., TAGLE, D.A., SMITH, S., UZIEL, T., SFEZ, S., 1995, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar Top1-3 kinase. *Science*, 268, 1749- 1753.
- SAWYER, D.E., MERCER, B.G., WIKLENDT, A.M., AITKEN, R.J., 2003, Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat. Res.*, 529, 21- 34.
- SAWYER, D.E., VAN HOUTEN, B., 1999, Repair of DNA damage in mitochondria, *Mutat. Res.*, 434, 161-176.
- SCHEFFNER, M., MÜNGER, K., BYRNE, J.C., HOWLEY, P.M., 1991, The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *PNAS USA*, 88, 5523- 5527.

- SCHRAUFSTATTER, I.U., BROWNE, K., HARRIS, A., HYSLOP, P.A., JACKSON, J.H., QUEHENBERGER, O., COCHRANE, C.G., 1990, Mechanisms of hypochlorite injury of target cells, *J. Clin. Invest.*, 85 (2), 554–562.
- SCHWARZ, E., KARL FREESE, U., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A., ZUR HAUSEN, H., 1985, Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells, *Nature*, 314, 111-114.
- SERVILI, M., BALDIOLI, M., SELVAGGINI, R., MINIATI, E., MACCHIONI, A., MONTEDORO, G., 1999, High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D and 2D nuclear magnetic resonance characterization, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 873- 882.
- SHACKELFORD, R.E., KAUFMANN, W.K., PAULES, R.S., 2000, Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Bio. Med.*, 28 (9), 1387- 1404.
- SHACTER, E., 2000, Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.*, 32 (3), 307-326.
- SHANNON, J.E., 1972 , *The American type culture collection, Registry of animal cell lines*, 2nd ed., Parklawn Drive Rockville- Maryland, 301, 881- 2600.
- SINGH, M., SHARMA, H., SINGH, N., 2007, Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway, *Mitochondrion*, 7, 367- 373.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem*, 150, 76- 85.
- STADTMAN E.R., 2006, Protein oxidation and aging, *Free Radical Res.*, 40(12), 1250–1258.
- STADTMAN, E.R., MOSKOVITZ, J., BERLETT, B.S., LEVINE, R.L., 2002, Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell. Biochem.* 234- 235(1), 3-9.
- STEFANOUDAKI, E., KOTSIFAKI, F., KOUTSAFTAKIS, A., 1999, Classification of virgin olive oils of the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition, *Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 623- 626.
- SVOBODOVA, A., PSOTOVA, J., WALTEROVA, D., 2003, Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review, *Biomed. Papers*, 147 (2), 137-145.
- TABATABAIE, T., POTTS, J.D., FLOYD, R.A., 1996, Reactive oxygen species mediated inactivation of pyruvate dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 336 (2), 290- 296.

- TAKEUCHI, T., NAKAJIMA, M., MORIMOTO, K., 1996, Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells, *Carcinogenesis*, 17 (8), 1543- 1548.
- THEROND, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A., CONTI, M., LEGRAND, A., 2000, Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 3 (5), 373- 384.
- TSURUTA, T., TANI, K., HOSHIKA, A., 1999, Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid growth factors in normal and leukemic cells. *Leukemia Lymphoma*, 32 (3- 4), 257- 67.
- TURRENS, J.F., 1997, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.*, 17 (1), 3- 8.
- URSINI, F., MAIORINO, M., BRIGELIUS-FLOHE, R., AUMANN, K. D., ROVERI, A., SCHOMBURG, D., FLOHE, L., 1995, Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252, 38–53.
- VAN HOUTEN, B., WOSHNER, V., SANTOS, J.H., 2006, Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress, *DNA repair*, 5, 145- 152.
- VAYALIL, P.K., ELMETS, C.A., KATIYAR, S.K., 2003, Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of mapk proteins in skh-1 hairless mouse skin, *Carcinogenesis*, 24 (5), 927- 936.
- VERMEULEN, W., DE BROER, J., CITTERIO, E., VAN GOL, A.J., VAN DER HORST, G.T., JASPERS, N.G., DE LAAT, W.L., SIJBERS, A.M., VAN DER SPEK, P.J., SUGASAVA, K., 1997, Mammalian nucleotide excision repair and syndromes, *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 309- 315.
- VISIOLI, F., BELLOMO, G., GALLI, C., 1998, Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 247, 60-64.
- VISIOLI, F., GALLI, C., 1998, The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev*, 56, 142- 147.
- VISIOLI, F., GALLI, C., GALLI, G., CARUSO, D., 2002a, Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 677-684.
- VISIOLI, F., POLI, A., GALLI, C., 2002b, Antioxidant and other biological activities of phenols from olive and olive oil, *Med. Res. Rev.*, 22 (1), 65-75.
- VISSERS, M.N., ZOCK, P.L., WISEMAN, S.A., MEYBOOM, S., KATAN, M.B., 2001, Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 55, 334- 341.
- WAGNER, B.A., BUETTNER, G.R., BURNS, C.P., 1994, Free radical-mediated lipid peroxidation in cells : oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content, *Biochemistry*, 33 (15), 4449-4453.

- WALLACE, S.S., 2002, Biological consequences of free radical-damage DNA bases, *Free Radical Bio. Med.*, 33 (1), 1- 14.
- WANG, A.L., LUKAS, T.J., YUAN, M., NEUFELD, A.H., 2008, Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid, *Mol. Vis.*, 14, 644- 651.
- WANG, Y., LEE, P., SHIH, C., CHEN, H., LEE, C., CHANG, Y., HSU, Y., LIANG, Y., WANG, L., HAN, W., WANG, Y., 2003, Damage formation and repair efficiency in the p53 gene of cell lines and blood lymphocytes assayed by multiplex long quantitative polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.*, 319, 206-215.
- WARDMAN, P., CANDEIAS, L.P., 1996, Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.*, 145 (2), 523–31.
- WATSON, D.G., ATSRIKU, C., OLIVEIRA, E.J., 2003, Review: role of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in biological systems, *Anal. Chim. Acta*, 492, 17-47.
- WEI, H., CAI, Q., RAHN, R., 1996, Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein, *Carcinogenesis*, 17: 73- 77.
- WEI, Y., LEE, H., 1997, Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 217: 53-63.
- WEINBRENNER, T., FITO, M., TORRE, R., SAEZ, G., RIJKEN, P., TORMOS, C., COOLEN, S., ALBALADEJO, M.F., ABANADES, S., SCHRODER, H., MARRUGAT, J., COVAS, M.I., 2004, Olive oil high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men, *J. Nutr.*, 134, 2314- 2321.
- WOOD, R.D., MITCHELL, M., SGOUROS, J., LINDAHL, T., 2001, Human DNA repair genes, *Science*, 291, 1284- 1289.
- YAKES, F.M., VAN HOUTEN, B., 1997, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Cell Biol.*, 94: 514-519.
- YAN, L.J., TRABER, M.G., KOBUCHI, H., MATSUGO, S., TRITSCHLER, H.J., PACKER, L., 1996, Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 327 (2), 330- 334.
- YOSHIDA, A., URASAKI, Y., WALTHAM, M., BERGMAN, A.C., POURQUIER, P., ROTHWELL, D.G., INUZUKA, M., WEINSTEIN, J.N., UEDA, T., APPELLA, E., HICKSON, I.D., POMMIER, Y., 2003, Human apurinic/aprimidinic endonuclease (ape1) and its n-terminal truncated form (an34) are involved in DNA fragmentation during apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 278 (39), 37768- 37776.

- YOSHINO, M., HANEDA, M., NARUSE, M., HTAY, H.H., IWATA, S., TSUBOUCHI, R., MURAKAMI, K., 2002, Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA, *Toxicology In vitro*, 16, 705- 709.
- YOST, F.J., FRIDOVICH, I., 1973, An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 248 (14), 4905–4908.
- YU, Z., CHEN, J., FORD, B.N., BRACKLEY, E., GLICKMAN, B.W., 1999, Human DNA repair systems: an overview, *Environ. Mol. Mutagen.*, 33, 3- 20.
- ZAMZAMI, N., KROEMER, G., 2001, The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens, *Nat. Rev.*, 2, 67- 71.
- ZAVODNIK, I.B., LAPSHINA, E.A., ZAVODNIK, L.B., BARTOSZ, G., SOSZYNSKI, M., BRYSEWSKA, M., 2001, Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Bio. Med.*, 30 (4), 363- 369.
- ZHANG, X., CAO, J., JIANG, L., ZHONG, L., 2009, Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in THP-1 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (4), 578- 582.
- ZHOU, J., AHN, J., WILSON, S.H., PRIVES, C., 2001, A role for p53 in base excision repair, *EMBO J.*, 20, 914- 923.

ÖZGEÇMİŞ

15.08.1977 tarihinde Denizli’de doğdum. 1994 yılında Denizli Lisesi’nden mezun oldum. 1994 yılında Lisans öğrenimime başladığım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 1998 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç.O.M.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı’nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım. “Ökaryotik Transkripsiyon Üzerine Elektromanyetik Alanın Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezimi 2001 yılında tamamladıktan sonra, aynı yıl İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Doktora programına kayıt oldum. Ekim 1999-2001 tarihleri arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştıktan sonra, 2001 yılında 35. madde uyarınca İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne görevlendirilmiş olup o tarihten bu yana aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

YAYINLAR

- **EROL Ö**, OLDACAY S, ERDEM G., 2003 *Saccharomyces cerevisiae* ve *Escherichia coli* türlerinin elektromanyetik alandaki üreme davranışları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33 (3), 191- 196.
- **EROL, Ö.**, ERDEM, G., 2004, Elektromanyetik alanın maya hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 61 (1,2,3), 23- 28.
- ENGIN K.N., KOCABORA, M.S., ERDEM-KURUCA, S., AKGÜN-DAR, K., **DAYI-EROL, Ö.**, 2009. Method Description for Obtaining Primary Fibroblast Cultures from Human Tenon’s Capsule, *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*, 18 (2),108-112.
- HAMAD, I., **EROL-DAYI, Ö.**, PEKMEZ, M., ÖNAY-UÇAR, E., ARDA, N., 2010, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Aphanes arvensis* Extracts, *Plant Food Hum. Nutr.*, 65, 44- 49.