

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ
ASETİLSALİSİLİK ASİTİN LENFOSİT HÜCRE
KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seyhan (NAHYA) TAŞKIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA

2015

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ
ASETİLSALİSİLİK ASİTİN LENFOSİT HÜCRE
KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seyhan (NAHYA) TAŞKIN

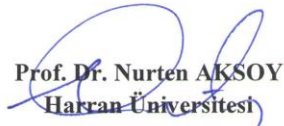
DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY


Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13156 proje numarası ile desteklenmiştir.

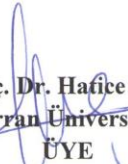
ŞANLIURFA
2015

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Seyhan (NAHYA) TAŞKIN'ın hazırladığı “Farklı Konsantrasyonlardaki Asetilsalisilik Asitin Lenfosit Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması” konulu çalışma, 30.01.2015 tarihinde jüri üyeleri tarafından Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Nurten AKSOY
Harran Üniversitesi
DANIŞMAN/BAŞKAN


Prof. Dr. A. Ziya KARAKILÇIK
Harran Üniversitesi
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Hafice SEZEN
Harran Üniversitesi
ÜYE


30.01.2015
ONAY
Prof. Dr. Nurten AKSOY
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yetişmemde büyük emekleri olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum ayrıca bilgi ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nurten AKSOY'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini içtenlikle paylaşan, bana yol gösteren, yetişmemde katkıları olan hocalarım Prof. Dr. A. Ziya KARAKILÇIK'a, Yrd. Doç. Dr. Hatice SEZEN ve Yrd. Doç. Dr. Emin ŞAVİK'e

Beraber görev yaptığım, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan değerli Asistan arkadaşlarım Dr. Ahmet KAYMAZ, Dr. Ali Said KADAK, Dr. Bülent ADAR'a, Mehmet DOĞAN'a ve tüm Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, tezimin maddi desteğini sağlayan HÜBAK'a

Beni bu günlere getiren, hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen, eğitimim boyunca maddi, manevi her türlü desteği sağlayan, beni bir an olsun yalnız bırakmayan ve daima motive eden AİLEME,

Hayatı birlikte paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum, desteğini her an hissettiğim eşim Öğr. Gör. Abdullah TAŞKIN'a ve mutluluk kaynağımız biricik kızım Zeynep Ela'ya sonsuz teşekkür ederim...

Arş. Gör. Seyhan (NAHYA) TAŞKIN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	V
SİMGE ve KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aspirin.....	3
2.1.1. Tarihçesi.....	3
2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.1.3. Farmakokinetiği.....	5
2.1.4. Temel Etkileri.....	5
2.1.5. Etki Mekanizması.....	6
2.1.6. Aspirinin Klinik Kullanımı.....	8
2.1.7. Yan Etkileri.....	9
2.1.8. Aspirin Direnci.....	10
2.2. Genotoksisite ve DNA Tamir Mekanizmaları.....	12
2.2.1. DNA Hasarına Neden Olan Faktörler.....	14
2.2.2. DNA Hasarına Hücresel Yanıtlar.....	15
2.2.3. DNA Hasar Tipleri.....	16
2.2.4. Oksidatif Stres Etkisiyle Oluşan DNA Hasarı.....	16
2.2.5. DNA Tamir Mekanizmaları.....	17
2.3. Serbest Radikaller.....	18
2.3.1. Serbest Radikal Oluşum Kaynakları.....	19
2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	19
2.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	20
2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Demirbaş Malzemeler.....	25
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler.....	26

3.3.	Asetilsalisilik Asit (ASA) Konsantrasyonlarının Hazırlanması	27
3.4.	Hücre Kültürü Ortamının Hazırlanması.....	27
3.5.	Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu ve Hücre Kültürü	28
3.6.	Mononükleer Lökositlerin Sayımı	28
3.7.	Çalışma Gruplarının oluşturulması	29
3.8.	Hücrelerin İnkübasyonu.....	30
3.9.	Kullanılan Yöntemler ve Çalışma Prensipleri	31
3.9.1.	In Vitro Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksosite testi (MTT).....	31
3.9.2.	Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi	31
3.9.3.	Toplam Oksidan Seviye (TOS) Düzeyi Ölçümü.....	34
3.9.4.	Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Düzeyi Ölçümü.....	34
3.9.5.	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü	34
3.10.	Yapılan İstatistiksel Analizler	35
4.	BULGULAR	36
4.1.	In Vitro Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksosite testi (MTT) Bulguları	36
4.2.	TAS, TOS ve OSİ Bulguları	38
4.3.	DNA Hasarı Bulguları	44
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6.	KAYNAKLAR.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin moleküler şekilleri.....	3
Şekil 2. Aspirinin kimyasal sentezi.....	4
Şekil 3. Araşidonik asit metabolizmasının aspirin tarafından inhibisyonu.....	8
Şekil 4. Nükleik asitlerin yapısı ve elemanları.....	12
Şekil 5. DNA molekülü.....	13
Şekil 6. DNA hasarına neden olan etkenler.....	13
Şekil 7. DNA hasarı oluşumu ve sonuçları.....	15
Şekil 8. Oksidan-Antioksidan denge.....	18
Şekil 9: Deney protokolü.....	30
Şekil 10. DNA hasarlarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri.....	33
Şekil 11. MTT deneyi pleyt görüntüsü.....	37
Şekil 12. ASA konsantrasyonlarının MTT testi bulguları.....	37
Şekil 13. Deney gruplarının TAS düzeyleri.....	39
Şekil 14. Deney gruplarının TOS düzeyleri	41
Şekil 15. Deney gruplarının OSİ düzeyleri.....	43
Şekil 16. 1. Saat DNA hasarı sonuçları.....	44
Şekil 17. 2. Saat DNA hasarı sonuçları.....	44
Şekil 18. 3. Saat DNA hasarı sonuçları.....	44
Şekil 19. 24. Saat DNA Hasarı sonuçları.....	45
Şekil 20. 48. Saat DNA Hasarı sonuçları.....	45
Şekil 21. 72. Saat DNA Hasarı sonuçları.....	45
Şekil 22. Oksidatif stres indeksi ile DNA hasarı arasındaki pearson korelasyon analizi.....	46
Şekil 23. Total Antioksidan Seviye ile DNA hasarı arasındaki pearson korelasyon analizi...47	
Şekil 24. 24 saatlik inkübasyon sonrası görülen örnek DNA hasarı görüntüleri	48

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Asetilsalisilik asitin kimyasal özellikleri.....	4
Tablo 2. Araşidonik asit yolunda meydana gelen bazı ürünler ve etkileri.....	6
Tablo 3. DNA hasarı oluşturan etkenler.....	14
Tablo 4. Oksijen kaynaklı serbest oksijen radikalleri.....	20
Tablo 5. Antioksidan savunma sistemleri.....	24
Tablo 6. Çalışma gruplarının oluşturulması.....	29
Tablo 7. ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun TAS Düzeyleri.....	38
Tablo 8. ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun TOS Düzeyleri.....	40
Tablo 9. ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun OSİ Düzeyleri.....	42

SİMGE ve KISALTMALAR

ASA:	Asetilsalisilik asit
TAS:	Toplam antioksidan seviye
TOS:	Toplam oksidan seviye
OSI:	Oksidatif stres indeksi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
NSAID:	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
COX:	Siklooksijenaz
TxA ₂ :	Tromboksan A ₂
LPO:	Lipoksijenaz
LDL:	Düşük dansiteli lipoprotein
Da:	Dalton
CSID:	Called subscriber identification
TX:	Tromboksan
PG:	Prostaglandin
PGH ₂ :	Prostaglandin H ₂
PGHS:	Prostaglandin H sentetaz
ser ⁵²⁹ :	COX-1 enziminin 529. pozisyonundaki serin
ser ⁵¹⁶ :	COX-2'de ise 516. pozisyonundaki serin
15-R-HETE:	15-R-Hidroksi-eikosatetraenoik asit
ATP:	Adenozin trifosfat
A:	Adenin
T:	Timin
C:	Sitozin
G:	Guanin
UV:	Ultraviyole
O ₂ [•] :	Süperoksit radikali
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
OH [•] :	Hidroksil radikali
ROS:	Reaktif oksijen türleri
NO ₂ :	Nitrojen dioksit

ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
N ₂ O ₃ :	Dinitrojen trioksit
HNO ₃ :	Nitrik asit
NER:	Nükleotid eksizyon tamiri
MER:	Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri
NHEJ:	Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması
HR:	Homolog Rekombinasyon
Fe:	Demir
Cu:	Bakır
Mn:	Manganez
Mo:	Molibden
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotit
FADH ₂ :	Flavin adenin dinükleotit
PUFA:	Çoklu doymamış yağ asitleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
GSH-Px:	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx:	Glutasyon redüktaz
DMSO:	Dimetil sülfoksit
FBS:	Fetal Bovin Serum
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
HKÇ:	Hücre kültür çözeltilisi
HS:	Hücre Süspansiyonu
MTT:	3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NMP:	Normal melting point
LMP:	Low melting point
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit

ÖZET

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASETİLSALİSİLİK ASİTİN LENFOSİT HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Seyhan TAŞKIN

Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans Tezi

Asetilsalisilik asit (ASA) ticari formuyla aspirin, trombosit agregasyonunu önlemede güçlü bir silah olmakla beraber eski çağlardan beri analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar olarak kullanılan, dünya üzerinde en çok tüketilen ilaçlardan biridir. Aspirin siklooksijenaz enzim inhibisyonu yapan non-steroid antiinflamatuvar ilaçlardandır. Antitrombotik etkisi sebebiyle aspirinin, kardiyovasküler hastalıklarda primer ve sekonder korunmada etkin bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. ASA'nın siklooksijenaz yolundaki enzimlere seçiciliği farklı olduğundan antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiler oluşturmak için farklı terapötik dozlar kullanılmaktadır. ASA'nın hidroksil radikalini süpürerek, biyolojik hedefleri bu radikalın neden olduğu hücresel hasardan koruduğu ve dolayısıyla antioksidan özelliklerinin olduğu gösterilmektedir. Bu bilgiler ışığında biz, asetilsalisilik asitin farklı konsantrasyonlarının insan lenfosit hücre kültüründe 1., 2., 3., 24., 48. ve 72. saatlik inkübasyonlar sonundaki genotoksik ve oksidatif stres üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık. Bu kapsamda genotoksik etkiyi tespit etmek için Comet assay yöntemiyle DNA hasarını, oksidatif durumu belirlemek için ise Toplam antioksidan seviye (TAS), Toplam oksidan seviye (TOS) ve Oksidatif stres indeksi (OSI) düzeylerini araştırdık. Araştırma bulgularımıza göre ilk üç saatlik inkübasyon süreleri sonunda DNA hasarı, TAS, TOS ve OSI düzeyleri açısından, en uygun konsantrasyonun 5 mM ASA, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ise en uygun konsantrasyonun 1 mM ASA olduğunu bulduk. Sonuç olarak, ASA'nın insan lenfosit hücreleri ile uzun dönemli inkübasyonunda 1 mM ASA konsantrasyonunun, kısa süreli inkübasyonda ise 5 mM ASA konsantrasyonunun genotoksik ve oksidatif etkiler bakımından daha zararsız olduğu kanaatine vardık. Yan etkileri nedeniyle, tıbbi kullanım dozlarının belirlenmesi için daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Asetil salisilik asit, Aspirin, DNA hasarı, TAS, TOS, OSI

ABSTRACT

EFFECTS OF ACETYLSALICYLIC ACID ON GENOTOXICITY AND OXIDATIVE STATUS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS ON LYMPHOCYTES IN *IN VITRO* CONDITIONS

Seyhan TAŞKIN

Master Thesis of Medical Biochemistry

Acetylsalicylic acid (ASA), commercially known as aspirin, a powerful weapon in the prevention of platelet aggregation as well as used to be an analgesic, antipyretic and anti-inflammatory medication since ancient times, is one of the most consumed drug in the world. Aspirin is one of the non-steroidal anti-inflammatory drugs that make inhibition of cyclooxygenase enzyme. Due to the effect of antithrombotic, aspirin has been shown to have an active role in the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases in the previous studies. To create anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects ASA is used at different therapeutic doses since it has different selectivity to enzymes in the cyclooxygenase pathways. ASA that sweep up hydroxyl radical, protects biological targets against cellular damage caused by the radical and thereby shown to be having antioxidant properties. In light of this information, we aimed to investigate genotoxic and oxidative-antioxidative effects of ASA at different concentrations in 1st, 2nd, 3rd, 24th, 48th, and at the end of 72 hours incubation on human lymphocytes in *in vitro* conditions. In this context, we investigated DNA damage, using comet assay method to detect genotoxic effects, we measured total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) to determine the oxidative status. According to our findings, at the end of the first 3 hour and 24, 48 and 72 hours incubation periods it was found that in terms of DNA damage, TAS, TOS and OSI the most suitable concentrations were 5 mM and 1 mM ASA, respectively. As a result, we concluded that in the long-term incubation of human lymphocyte cell with ASA 1 mM ASA concentration, on the other hand in short-term incubation 5 mM ASA concentration is less harmful in terms of genotoxic and oxidative effects. Because of its side effects, further *in vitro* and *in vivo* studies are required for determination of the medical doses.

Keywords: Acetylsalicylic acid, Aspirin, DNA Damage, TAS, TOS, OSI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asetilsalisilik asitin etken maddesi salisilik asit, Sümerler tarafından 4000 yıl önce söğüt ağacından elde edilmesiyle tıptaki kullanımı başlamış olup, ilk sentetik formu olan aspirin kimyager Felix Hoffmann'ın 1897'de salisilik asiti asetilleyip saf asetilsalisilik asit (ASA) üretmesiyle ortaya çıkmıştır. İlk kullanımı ağrı kesici amaçlı olsa da etki mekanizmasının keşfiyle beraber antiinflamatuvar, antipiretik ve antitrombotik etkilerinden de yararlanılmaya başlanmıştır. Oral olarak alınan ve gastrointestinal sistemle hızla emilimi gerçekleşen ASA, kanda ve karaciğerde hidrolize olarak aktif metaboliti salisilik asite dönüşerek plazma proteinleri vasıtasıyla bütün vücuda dağılır.

Aspirin; toksisitesi göreceli olarak az, sık reçete edilen ve sık tüketilen bir ilaçtır. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) grubunda incelenen aspirinin temel etki mekanizması, siklooksijenaz enzim blokajı yaparak, prostaglandin sentezini geri dönüşümsüz olarak durdurmasıdır. ASA'nın siklooksijenaz yolağındaki enzim blokajı ile analjezik, antiinflamatuvar, antipiretik, antitrombotik etkiler oluşturduğu gösterilmektedir (2).

Aspirinin antitrombotik etkisi ile serebrovasküler hastalık ve miyokard iskemisine karşı koruyucu etkinliğinin gösterilmesi kalp ve beyin hastalıklarındaki kullanımını, antiinflamatuvar ve analjezik özelliklerinin bir arada bulunması ile de romatizmal hastalıklardaki kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Aspirin, trombositlerde bulunan siklooksijenaz (COX) enzimini kalıcı olarak inhibe ederek, tromboksan A2 (TxA2) oluşumunu engellemekte bu etkisinden dolayı kardiyovasküler hastalıkların primer ve sekonder korunmasında ve tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Başlıca yan etkileri gastrointestinal sistem üzerine olsa da renal, hepatotoksik, hematolojik ve kardiyovasküler sistem üzerine yan etkileri de mevcuttur. Salisilizm, kıkırdak toksisitesi, Tinnitus ve Reye sendromu gibi durumlar da aspirinin yüksek dozda veya uzun dönem kullanılması sonucu ortaya çıkmaktadır (12).

ASA'nın siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LPO) basamaklarına olan inhibitör etkilerine ilave olarak, hücre zarı, lenfosit, nötrofil fonksiyonları ve lizozomal enzim salınımı gibi olayları da etkileyebildiği belirtilmektedir. NSAID'ın bilinen sağaltıcı etkilerinin oluşumunda serbest oksijen radikallerinin parçalanması ve daha zararsız moleküllere dönüştürülmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (11,10).

Aspirinin antioksidan etkilere sahip olduğu, direkt olarak hidroksil radikallerini uzaklaştırdığı, süperoksit radikali üretimini baskıladığı, prooksidan bileşik hidrojen peroksit yapımını inhibe ettiği ve düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) oksidatif modifikasyondan koruduğu literatür kaynaklarında mevcuttur (1).

Antiinflamatuvar, analjezik, antipiretik ve antitrombotik etkilerinden dolayı asetilsalisilik asit, ticari formuyla aspirin dünyada en çok tüketilen ilaçlardan biridir. Türkiye'de her yıl ortalama 20-25 milyon adet satıldığı belirlenen aspirinin, tropikal ve sistemik etkileri göz önüne alındığında sanıldığı kadar masum bir ilaç olmadığı düşüncesi akla gelmektedir. Klinik kullanımında, aspirinin siklooksijenaz grubu enzimlere olan farklı ilgisinden dolayı, antitrombotik veya antiinflamatuvar etki oluşturmak için farklı dozları kullanılmaktadır.

Bu çalışmada; antiinflamatuvar, antipretik, antitrombotik ve analjezik etkileri olan ve antioksidan özelliğinden de bahsedilen ASA'nın, literatür bilgileri de göz önüne alınarak; farklı dozlarda oluşturulan konsantrasyonlarının *in vitro* insan lenfosit hücre kültürü ortamında farklı inkübasyon süreleri sonundaki genotoksik ve oksidatif etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla genotoksik etkiyi tespit etmek için DNA hasarı, oksidatif/antioksidatif durumu tespit etmek için ise toplam oksidan seviye, toplam antioksidan seviye ve oksidatif stres indeksi tespit edilip değerlendirilecektir.

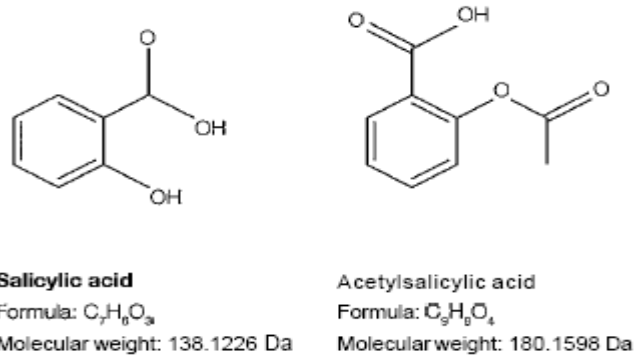
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aspirin

Aspirin yüzyılı aşkın süredir keşfi yapılmasına rağmen kullanım alanı her gün genişleyen, hakkında yeni bilgiler edinilen ve hala en sık kullanılan analjeziklerin başında gelmektedir. Ana bileşiği sodyum salisilat olan bu organik asit; toksisitesi düşük, genellikle oral kullanımı olan ucuz NSAID grubundan bir ilaçtır.

2.1.1. Tarihçesi

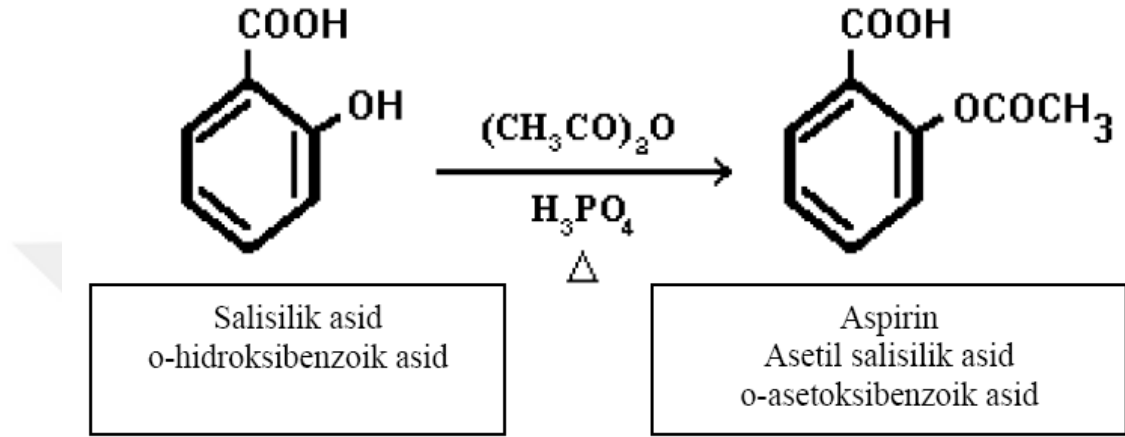
Aspirin, ilk kez 1853 yılında Carl R. Gerhardt tarafından sentezlenmiştir. 1897'de Bayer'in araştırma laboratuvarlarında kimyager olarak çalışan Felix Hoffman daha fazla etki elde etmek amacıyla; salisilik asitin benzen halkası üzerindeki hidroksil grubunu asetilleyerek ASA oluşturmuş ve romatoid arthritis olan babasına bu ilacı vermesi ile bu ilacın terapötik kullanımı başlamıştır. Henrich Dresser bu yeni ilaca *aspirin* adını vermiştir (3,4). İlacın keşfi 1897'de gerçekleşmesine rağmen klinik kullanımına yaklaşık yarım asır sonra başlamıştır.



Şekil 1: Salisilik asit ve Asetilsalisilik asitin moleküler şekilleri (5)

2.1.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Fenolik bir bileşik olarak salisilik asit, uygun bir asetilleyici reaktif ile reaksiyona sokulduğunda çok yaygın bir analjezik olan aspirin adıyla bilinen asetilsalisilik asit elde edilir (13).



Şekil 2: Aspirinin kimyasal sentezi

Asetilsalisilik asit molekül ağırlığı 180.1598 Da olan, beyaz kristal toz veya granül halinde, kokusu olmayan, hafif ekşi, acı renksiz bir tozdur. Su içinde kolayca erimezken sodyum karbonat içinde erir.

Tablo 1: Asetilsalisilik asitin kimyasal özellikleri (15)

Kimyasal adı	Asetilsalisilik asit (2-Asetoksibenzoik asit)
CSID	2157
Kimyasal Formülü	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$
Molekül ağırlığı	180.1598 Da
Erime noktası	136°C
Kaynama noktası	140°C
Yoğunluğu	1,40 g/cm ³

2.1.3. Farmakokinetiği

Aspirin, mide ve ince bağırsağın üst kısmından hızlı bir şekilde emilir. Alınımından 30-40 dakika sonra plazmada en üst düzeye ulaşır ve ortalama bir saat sonra trombosit inhibisyonu görölmektedir. Enterik kaplı aspirinlerde plazmada üst düzey konsantrasyona ulaşmak için 3-4 saat gerekmektedir. Acil etkinlik istenilen durumlarda (kararsız anjina veya akut miyokard infarktüsü gibi) enterik kaplı aspirinlerin çiğnenmesi önerilmektedir. Oral biyoyararlanımı ortalama % 40-50 arasındadır ve enterik kaplı, uzun salınımlı ve mikrokapsüllü formulasyonların biyoyararlanımı daha düşüktür. Aspirinin yarılanma ömrü 15-20 dakika olup, dolaşımdan hızla temizlenir (6). Midede gıda olması ve alkali mide ortamı aspirinin emilimini azaltmakta; aspirinin sodyum tuzları daha hızlı emilmekte; antiasitler emilimi ve atılımı arttırmakta; steroid kullanımı serum düzeyini azaltırken idrarın alkalileşmesi atılımı arttırmaktadır (12).

Aspirin karaciğer ve kanda salisilata hidrolize edilir. Salisilat aspirine göre daha fazla oranda plazma proteini olan albümine bağlanır. Oral olarak 600 mg aspirin verilmesi ile kanda en fazla 4 mg/dl'lik düzey oluşur. Aspirinin letal dozu 20 gramdır ve bu dozda oral alımda plazma düzeyi 50 mg/dl'dir. İlaç ekstraselüler sıvı kompartmanlarında oldukça homojen olarak dağılır.

Aspirin ve aspirinin hidroliziyle oluşan sodyum salisilat doza bağımlı kinetik ile elimine edilir. Verilen doz az ise karaciğerde büyük çoğunluğu glisin ile konjuge edilmek suretiyle salisürik asit olarak böbreklerden itrah edilir. Çok az bir kısmı glukronat konjugatı ve gentizik asit şeklinde veya serbest salisilat olarak itrah edilir. Verilen doz yüksek ise eliminasyon sıfır derece kinetiğine uyar ve büyük bir kısmı serbest salisilat olarak itrah edilir. Oral 300 mg dozun yarı ömrü 3 saat iken 10 gram verilirse bu süre 19 saattir (7).

2.1.4. Temel Etkileri

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların eokosanoidleri inhibe etmeleri sonucunda merkezi ateş, ağrı, yangı ve preagrasyonu engellemektedirler. Analjezik, antiinflamatuvar, antiendotoksemik, antitrombotik, antikanserojenik ve kondroprotektif etkileri bulunmaktadır. İyi bilinen COX ve LPO inhibitör etkilerine ilave olarak, hücre zarı, lenfosit, nötrofil fonksiyonları ve lizozomal enzim salınımı gibi olayları da etkileyebildiği belirtilmektedir.

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların bilinen sağaltıcı etkilerinin oluşumunda serbest oksijen radikallerinin parçalanması ve daha zararsız moleküllere dönüştürülmelerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (11,10).

2.1.5. Etki Mekanizması

Aspirinin gerçek etki mekanizması uzun yıllar tam olarak anlaşılmamıştır. John R. Vane 1971’ de aspirinin COX’u irreversibl olarak asetillediğini ve prostaglandin sentezini inhibe ettiğini keşfetmiştir. Bu buluşu ile 1982 Nobel Tıp Ödülünü almıştır (8). Aspirin diğer nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar gibi siklooksijenaz enzimini bloke ederek, araşidonik asitten tromboksan (TX) ve prostaglandin (PG) oluşmasını engeller (12). Araşidonik asitler hücre dışı haberci moleküller olarak kabul edilirler. Hücrede depolanmazlar, kimyasal ya da mekanik bir uyarı olduğunda fosfolipaz A ve fosfolipaz C enzimleri tarafından membran fosfolipitlerinden sentezlenirler (14). Araşidonik asit prostaglandin G/H sentetaz ile stabil olmayan prostaglandinler olan G2 ve H2’ye metabolize olur. PGH2, doku ve hücrelerde spesifik izomeraz ve sentetazlar ile stabil prostanoidler olan PGE2, PGI2, TXA2, PGD2 ve PGF2 α ’ya dönüşür (16).

Tablo 2: Araşidonik asit yolunda meydana gelen bazı ürünler ve etkileri (23)

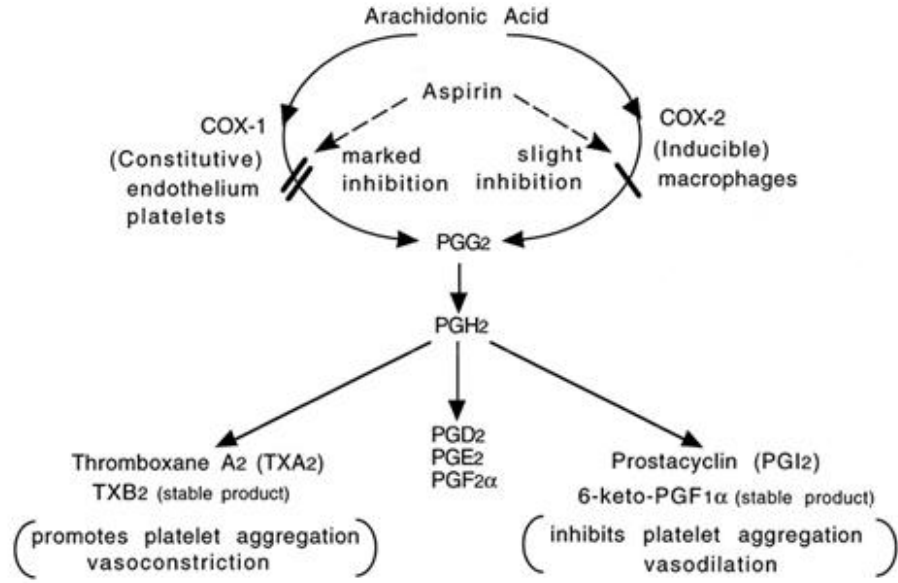
Siklooksijenaz ürünleri	
➤ PGE1, PGE2	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon ve vasküler permeabilitede artma• Bronş düz kaslarında gevşeme• Mide asit salgısında azalma• Trombosit agregasyonunun inhibisyonu• Oksitosik etki• Lökosit infiltrasyonu
➤ PGD2	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon• Bronkokonstriksiyon
➤ PGF2-alfa	<ul style="list-style-type: none">• Ven ve venüllerde büzüşme• Bronkokonstriksiyon• Oksitosik etki
➤ Prostaglandin	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon• Trombosit agregasyonunda inhibisyon• Fibrinolitik etkinlik
➤ Tromboksan A2	<ul style="list-style-type: none">• Vasküler permeabilitede artma• Trombosit agregasyonunda stimülasyon• Vazokonstriksiyon
Lipoksijenaz ürünleri	
➤ Lökotrienler	<ul style="list-style-type: none">• Kapiller permeabilitede artma• Hiperaleji• Lökosit aktivasyonu ve damar endoteline yapışması• Bronkokonstriksiyon

Membrana bağılı bulunan siklooksijenaz veya prostaglandin H sentaz (PGHS), glikoprotein ve hemoprotein (72 kDa moleküler ağırlığında) yapıdadır, prostanoid üreten hücrelerin endoplazmik retikulumunda bol miktarda bulunur. Bu molekül hem araşidonik asiti siklik hale getirerek hem de PGG2 oluşturmak üzere 15-hidroperoksi grubu ekleyerek COX aktivitesi gösterir (4).

COX' un iki izoformu (COX-1 ve COX-2) vardır. COX-2 indüklenebilen bir enzim iken, COX-1 yapısal bir enzimdir. COX-2 inflamasyon ile indüklenmektedir. COX-1 ekspresyonu normal fizyolojik koşullarda mide mukozasında, trombositlerde, endotel hücrelerinde ve böbreklerde görülür. Hücre koruyucu prostaglandinlerin yapımından sorumludur. Gastroproteksiyon, trombosit agregasyonu, homeostatik olaylar ve sodyum-su regülasyonunda rol oynar. COX-2 inflamatuvar stimulus ile indüklenir. COX-2'nin hem inflamasyon hem de karsinogenezde rolü olduğu düşünülmektedir. Vasküler endotelde antiagregan özelliğe sahip olan prostasiklin de COX-2 ile oluşmaktadır (4,16).

Aspirin, COX-1'de bir serin rezidüsünü hızlı ve geri dönüşsüz bir şekilde asetilasyona uğratarak trombositler üzerinde etki gösterir, trombosit agonisti olan tromboksan A2'nin oluşumunu ve salımını inhibe eder, böylece aspirin tromboksan A2'nin trombosit agregasyonuna ve diğer trombosit yanıtlarına katkısını etkili olarak bloke eder (17).

Bu inhibisyon COX-1 enziminin 529. noktasındaki serinin (ser⁵²⁹), COX-2'de ise 516 noktasındaki serinin (ser⁵¹⁶) asetillenmesi ile olmaktadır (16). Asetillenen enzimin aktivitesi geri dönüşsüz olarak baskılanmaktadır. Aspirin COX-2'i ser⁵¹⁶'dan asetiller ama sonuçta bu enzimin aktivitesi sadece modifiye olur. Asetile COX-2 prostaglandin G2 değil 15-R-Hidroksi-eikosatetraenoik asit (15-R-HETE) üretir (18,19).



Şekil 3: Araşidonik asit metabolizmasının aspirin tarafından inhibisyonu (22)

Aspirin, COX-1'i hızlı ve geri dönüşsüz bir şekilde inhibe ederken, aspirin olmayan NSAID'ler zaman bağımlı ve geri dönüşümlü olarak COX-1 supresyonu sağlarlar (20). Aspirin dışındaki NSAID grubu ilaçların COX-1 ve COX-2 ye olan ilgisi eşittir. Aspirinin ise COX-1'e olan ilgisi COX-2'den 100-150 kat daha fazladır. COX izoenzimlerinin inhibisyonu aspirinin dozu ile ilişkilidir. Düşük doz aspirin COX-1'i inhibe edebilirken, COX-2'nin inhibisyonu için ise yüksek dozlar gerekmektedir. Bu durum antitrombotik etki (COX-1 enzimiyle) ve anti-inflamatuvar etki (COX-2 enzimiyle) elde etmek için aspirinin neden farklı dozlarda kullanıldığını açıklar (21).

2.1.6. Aspirinin Klinik Kullanımı

ASA'nın klinik kullanımında antipiretik, antitrombotik, antiinflamatuvar ve analjezik etkileri göze çarpmaktadır (12).

- Antipiretik etki; Aspirin santral olarak ve PG sentez inhibisyonu yaparak antipiretik etkisini gösterir. Dolaşımdaki ve yerleşik monositer fagositlerden salınan pirojenler, anterior hipotalamusta PG yapımını uyarır; oluşan PGE2 hipotalamusun eşığının değişmesine ve ateşe neden olur. Aspirin PG yapımını engelleyerek ateşin oluşmasını engeller; bu etkisi antiinflamatuvar etkisi için gerekli dozlardan daha düşük dozlarda ortaya çıkar.

- Analjezik etki; Aspirinin basit analjezik olarak kullanımı yaygındır. Salisilat metaboliti orta derecede ve özellikle inflamatuvar kökenli olan ağrılarda etkili olmaktadır. İnflamasyonda PG sentezinin uyarılması, bradikinin gibi araçlarla (mediatör) sinirleri ağrılı uyarılara duyarlı hale getirmektedir. Aspirin PG sentezini inhibe ederek sinirlerin uyarılmasını engellemekte ve ağrı oluşumunu azaltmaktadır.
- Antiinflamatuvar etki; Aspirin PG'lerin tüm hücrelerde yapım ve salınımını engelleyerek inflamatuvar yanıtı azaltır. PGE2 ve prostasiklin; vasküler geçirgenliği artırarak ödem ve lökosit infiltrasyonuna ve endojen inflamatuvar araçların ve bradikininin ağrı yapıcı etkisinin artmasına neden olur. Nötrofil ve monosit migrasyonunu hücre yüzeyine direk etki ederek damar dışına geçişlerini engeller.
- Antitrombotik etki; Aspirin trombosit COX enzimini inhibe ederek trombosit agresyonunu ve trombüs oluşumunu engeller. Aspirin bu etkisini düşük dozlarda ve geri dönüşümsüz olarak gösterir. Son dozu izleyen 4-7 gün etkisi sürer. Aspirin, bu etkisi nedeniyle Kawasaki ve antifosfolipid antikoru sendromlarının tedavilerinin ana öğelerinden biridir.

2.1.7. Yan Etkileri

Aspirin, kullanım alanı geniş bir ilaçtır. Terapötik indeks dışı kullanım ve uzun süreli kullanım organ ve dokularda hasar oluşturmaktadır. Gastrointestinal sisteme ait yan etkiler; gastrit, duodenal ülserler, gastrointestinal sistem kanaması ve bulantıdır. Renal yan etkiler; su ve tuz retansiyonu, ödem, geri dönüşümlü böbrek yetmezliği olduğu çalışmalarla belirlenmiştir (30). Reye sendromu, hepatotoksisite ve bronkospazm, salisilizm gibi hastalıklar diğer yan etkiler arasındadır.

Aspirinin etki mekanizmasını araştıran biyokimyasal çalışmalar ve antitrombotik etkinliğini değerlendiren klinik çalışmaların sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, doz yanıt ilişkisinin olmaması ve yan etkilerinin doz bağımlı olarak artması, çeşitli tromboembolik hastalıkların tedavisinde etkin olan en düşük doz aspirinin kullanımını desteklemektedir. En düşük etkin dozda aspirinin kullanılması (uzun dönem tedavide 50- 100 mg/gün), etkinliğini arttırmak ve yan etkileri minimuma indirmek için en uygun strateji gibi gözükmemektedir (29).

Moleküler düzeyde yan etkilerine değinecek olursak; kimyasal yapısından dolayı suda ve lipitde çözümlenme özeliğine sahip zayıf organik asit olan aspirin, hücrelerin yüzeyindeki fosfolipidlerle kolayca etkileşir. Bu etkileşim ilacın hücre içine girişini arttırır ve iyon tuzağı oluşması ve bunu elektron transport zincir inhibisyonu ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun durması izler. Oksidatif fosforilasyonun durması ile ATP sentezi büyük oranda durur. Hücre içi ATP azalmasının bir sonucu olarak, hücre içi Ca toksisitesi ve reaktif oksijen ürünleri (süperoksid radikali, hidroksil radikali) oluşur. Oluşan bu reaktif oksijen türleri, hücre proteinler, lipidler ve nükleik asitleri okside eder ve ayrıca hücre nekrozu ve apoptoz ile ilgili sinyal yolları aktive olur. Oksidatif fosforilasyonun durması sonucu mitokondriyal transmembran potansiyelini değıştirir ve sitokrom c salınır. Sitokrom c aracılı apoptozis oluşur (24-28).

2.1.8. Aspirin Direnci

Aspirin direnci, aspirin kullanımı ile ilgili önemli bir durumdur. Yapılan son çalışmalarda düzenli aspirin kullanımına rağmen bazı hastalarda aspirinin, trombosit aktivasyonu ve agregasyonunu önlemede yetersiz kaldığı gösterilmiştir.

Aspirin direnci klinik aspirin direnci ve laboratuvar yöntemleriyle saptanan aspirin direnci olarak iki farklı şekilde tanımlanabilir. Klinik aspirin direnci, aspirin reçete edilen hastalarda aspirinin aterotrombotik iskemik olayları önlemede yetersiz kalması olarak tanımlanırken; laboratuvar yöntemleriyle saptanan aspirin direnci, aspirinin TXA2 üretimini engelleyememesi veya TXA2 üretimine bağlı trombosit fonksiyon testlerini (örn. trombosit agregasyonu) inhibe edememesi olarak tanımlanır (31).

Aspirin direncinde rol oynayan faktörler aşağıda sıralanmıştır (32).

1. Klinik faktörler

- İlaç kullanımına uyumsuzluk veya yetersiz dozda ilaç alımı
- Kronik aspirin kullanımı
- Diyabet
- Sigara içme
- Hipertansiyon,
- Hiperkolesterolemi,
- Obezite,
- Gastrointestinal emilimde azalma
- İlaç etkileşimi; NSAID

2. Trombosit fonksiyonları etkileyen faktörler

- Trombosit aktivasyonunun COX-1 ve COX-2 dışı yollardan olması
- COX-1 ve COX-2 aktivitesinde artış
- Trombosit reaktivitesinde ve döngüsünde artış
- Tromboksan A2'nin yetersiz baskılanması
- Trombositlerin diğer kan hücreleriyle etkileşimi

3. Genetik Faktörler (Tek nükleotid polimorfizmi)

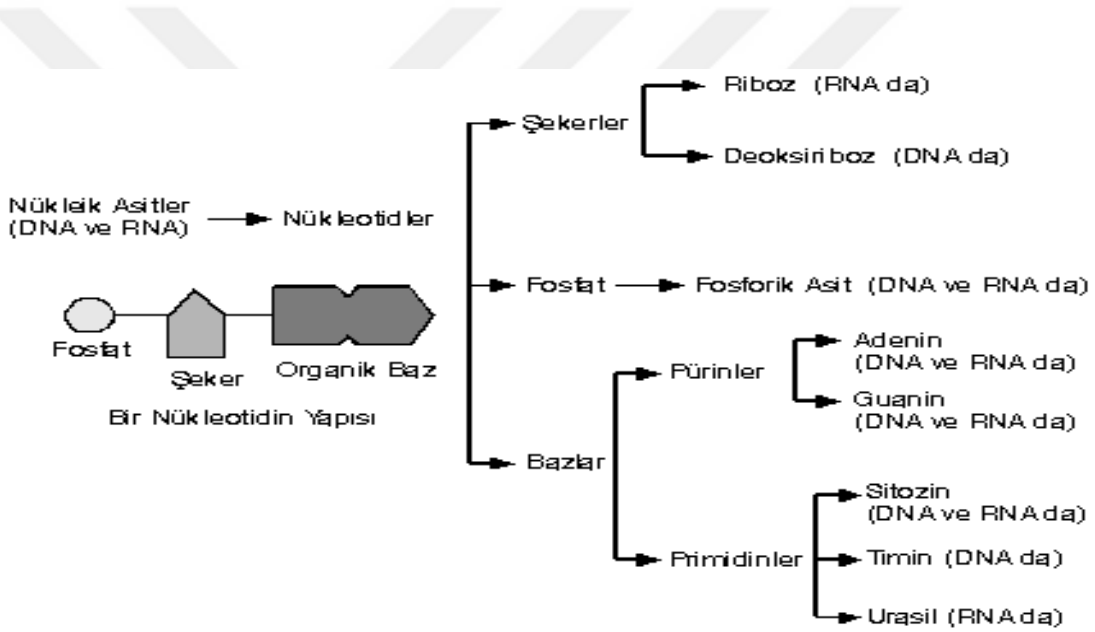
- Reseptörler: kollajen reseptörü, Tromboksan reseptörü.
- Enzimler: COX-1, COX-2, Tromboksan A2 sentaz

4. Diğer

- Aterotrombotik olmayan nedenler
- Kadın cinsiyet
- Egzersiz
- Stress
- Aspirin yanıtında değişkenlik
- Tedavi yetersizliği

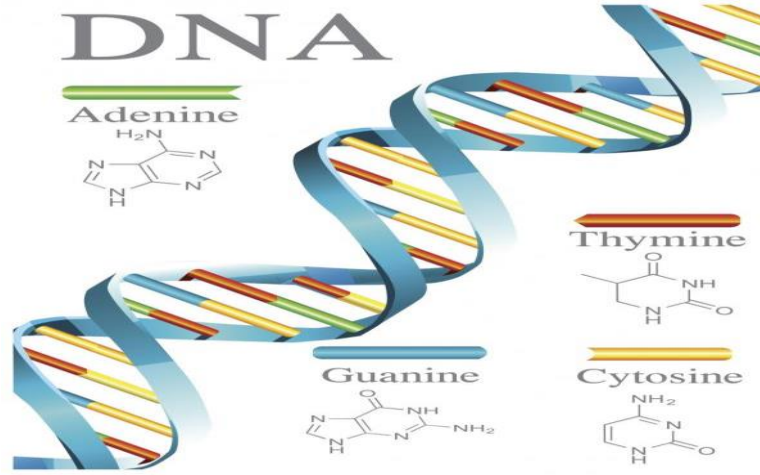
2.2. Genotoksisite ve DNA Tamir Mekanizmaları

19. yüzyılın sonlarında A.F.Miescher'in hücre çekirdeğini incelerken DNA molekülünü fark etmesiyle, bu gizemli molekülle ilgili araştırmalar başlamış olup günümüzde hala güncelliğini korumaktadır. Kimyasal olarak DNA, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur (37). Bu polimerlerin omurgaları, ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından oluşur. Merdiven basamaklarının arasında gevşek hidrojen bağlarıyla birbirini çeken pürin ve pirimidin denilen azotlu bazlar bulunur. Bu basamaklar merdivenin kenarındaki şeker moleküllerine bağlıdır. Her bir şeker grubuna baz olarak adlandırılan dört tip molekülden biri bağlıdır (34).



Şekil 4: Nükleik Asitlerin Yapısı ve Elemanları (38)

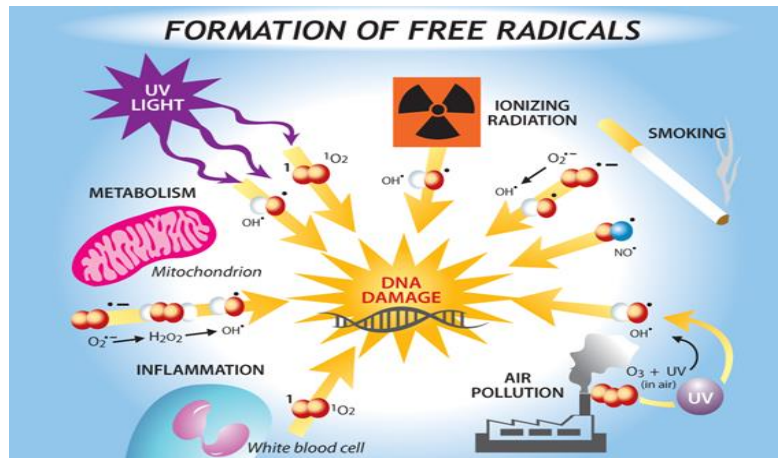
DNA molekülünde bulunan pürin ve pirimidin bazları; timin(T), adenin(A), sitozin(C) ve guanin(G)'dir. Bunlar DNA molekülünün bir iplikçliğini oluşturur. İki iplikçik, yani merdivene benzer yapının iki kolu, karşılıklı gelen baz çiftleriyle birbirine bağlanır. Bu iki iplikçik birbirlerine ters yönde giderler. Her baz çifti tek bir şekilde eşleşebilir. Her zaman T ile A ve G ile C birleşir. Sarmaşık dalına benzer her molekül, bir DNA "ipliği"dir. Bu iplikler birbirlerine kimyasal olarak bağlanmış nükleotitlerden oluşur. Nükleotitler ise bir şeker, bir fosfat ve bir de dört çeşit azotlu bazlardan birisinden oluşur. İşte bu nükleotitlerin DNA üzerinde sıralanışı, DNA dizilimini belirler. Genetik şifre de bu dizilimde yer alır (34).



Şekil 5: DNA molekülü (39)

Genetik şifre nesilden nesile DNA molekülü aracılığıyla iletilir. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler ‘DNA hasarı’ olarak adlandırılır. DNA molekülünün yapısında meydana gelen bir değişiklik şifrelerinde değişikliğe yol açacağından hatalı protein üretilmesine çeşitli mutasyonların, farklı fenotiplerin veya hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. DNA hasarını oluşturan nedenlerin en başında, çevresel şartlar ve diyetel faktörler, UV ışınlar ve teknolojik atıklar, eksoz dumanı, sigara gibi faktörler gelmektedir (33,34).

DNA hasarı sadece dış faktörlerden kaynaklanmaz. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücresel metabolizmanın yan ürün olarak üretilen serbest radikaller, hidrolitik reaksiyonlar ve non enzimatik metilasyonlar gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır (35).



Şekil 6: DNA hasarına neden olan etkenler (40)

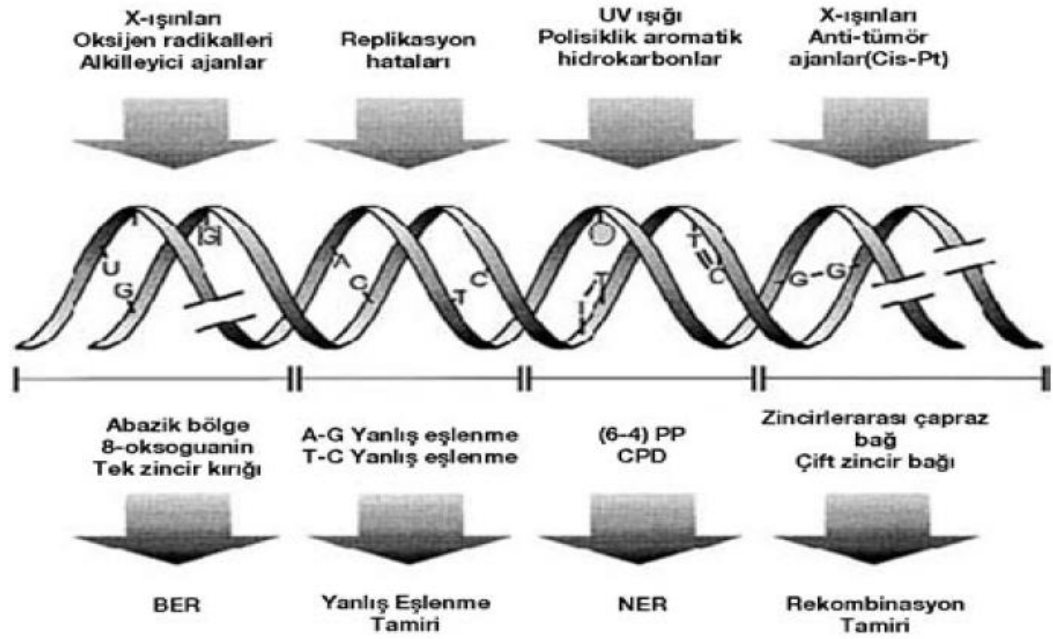
Canlıların her bir hücresinde günde onbinlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. Canlılara ait DNA moleküllerinde oluşan hasar, tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir. Dinamik bir yapıya sahip olan DNA molekülü, onarılabilen tek biyomolekül olması bakımından önemlidir (36). Normalde hasar ve tamir denge halindedir. Denge hasar lehine bozulduğunda tamir mekanizmaları yetersiz kalmakta, neticede hücre ölümü veya mutasyon, delesyon, insersiyon ve kanser oluşumu gibi DNA molekülünde kalıcı değişiklikler olabilmektedir. Oluşan DNA hasarı her ne kadar tamir mekanizmaları ile tamir edilmeye çalışılsa da, fazla hasar meydana geldiğinde tamir mekanizmaları yetersiz kalabilmektedir. DNA hasarını önlemenin yolu bir taraftan DNA molekülünü hasarlayan etkenlerden uzak dururken diğer taraftan DNA hasar oluşumunu önleyici tedbirler almaktır (34).

2.2.1. DNA Hasarına Neden Olan Faktörler

Endojen veya çevresel etkenler sonucu oluşabilecek DNA hasarları genomun replikasyonunu ve transkripsiyonu engelleyebileceği gibi onarılmadıklarında ya da doğru onarılmadıklarında mutasyonlara veya genomda hücrenin ya da organizmanın canlılığını tehdit eden delesyonlar, translokasyonlar ve anöploidi gibi daha büyük anomalilere neden olmaktadır (42).

Tablo 3: DNA Hasarı Oluşturan Etkenler

DNA Hasarı Oluşturan Etkenler	
Endojen Etkenler	Ekzojen Etkenler
Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar	Kimyasal ajanlar: kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları vb.
Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon	Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon vb.
Baz kayıpları: depurinasyon/depirimidinasyon	
Oksidatif Hasar: 100.000 /hücre/gün	
Replikasyon hataları	



Şekil 7: DNA hasarı oluşumu ve sonuçları

2.2.2. DNA Hasarına Hücresel Yanıtlar

Onarılabilen tek biyomolekül olan DNA molekülü, Oluşan hasarı her ne kadar tamir mekanizmaları ile tamir edilmeye çalışılsa da, fazla hasar meydana geldiğinde tamir mekanizmaları yetersiz kalabilmektedir.

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde dört önemli yanıt oluşur (35). DNA hasarı bu yanıtlardan herhangi biri ile düzeltilemezse hücre düzeyinde genomik kararsızlık ve mutasyonla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır.

1. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
2. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),
3. Hücredeki bazı genlerin transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz).

2.2.3. DNA Hasar Tipleri

DNA molekülünde ekzojen ya da endojen kaynaklarla oluşan mutajenik ajanlar, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. Yanlış şifre, hatalı protein sentezine yol açar. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik multifaktöriyel hastalıklara yol açmaktadır (43). Başlıca hasar tipleri;

- ✓ Deaminasyon
- ✓ T-T and T-C dimerleri oluşumu
- ✓ Alkilasyon
- ✓ Depurinasyon
- ✓ Replikasyon hataları
- ✓ Çift iplik kırıkları (DSB)
- ✓ Oksidatif hasarlar

2.2.4. Oksidatif Stres Etkisiyle Oluşan DNA Hasarı

Yapılan çalışmalar neticesine endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı kanısına varılmıştır. Serbest radikaller, DNA ataklarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. En güçlü serbest radikal olan Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Prooksidan bir bileşik olan Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür (44,45).

DNA hasarı oluşum nedenlerinin başında oksidatif kaynaklı hasar gelmektedir. Mitokondriyal solunum sonucu oluşan serbest radikaller ($-O_2^*$ / Süperoksit, H_2O_2 / Hidrojen peroksit, $-OH^*$ / Hidroksil), tek zincir kırıklarına ve 8-oksoguanin ve timin glikol gibi hasarlı bazların oluşmasına sebep olur, hücreler bu tip hasarlı bazların onarımı için özel glikozilazlar içerir (43). Farklı ROS türleri farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar. Örneğin O_2^* ve H_2O_2 hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH^* radikali DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır (46).

Oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonları hasar oluşturan endojen reaksiyonlar olup; Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit (ONOO-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrikasit (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler.

2.2.5. DNA Tamir Mekanizmaları

DNA molekülünün ihtiva ettiği içerik ve fonksiyonları düşünüldüğünde tamir mekanizmasının önemi anlaşılmaktadır. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar (34). DNA tamir mekanizmaları aşağıda sıralanmıştır.

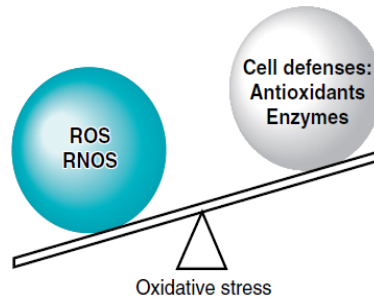
1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi
 - ✓ Fotoreaktivasyon
 - ✓ O6-metilguanin tamiri
 - ✓ Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu
2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri
 - ✓ Baz eksizyon tamiri
 - ✓ Nükleotid eksizyon tamiri (NER)
 - ✓ Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)
3. Replikasyon sonrası tamir
4. SOS Tamiri
5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri
 - ✓ Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması (NHEJ)
 - ✓ Homolog Rekombinasyon (HR)

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller veya oksidan moleküller, en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla ortaklaşmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküllerdir. Yapılarında eşleşmemiş elektron bulduklarından radikal olarak adlandırılırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklaşmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

Oksijen türevli radikaller, biyolojik sistemin en iyi bilinen serbest radikalleridir ve canlı hücrelerde, normal süreçte fizyolojik miktarlarda üretilirler. Çok miktarda üretildiklerinde hücre ve doku hasarına neden olabilirler. Yapılarındaki ortaklaşmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşim özelliği gösterirler (47,48). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (49). Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (50).

Serbest radikallerin yaşam süreleri çok kısa olmasına karşın, yüksek aktiviteleri nedeniyle organizmada yüksek düzeyde tahrip edicidirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı arasında denge olduğu sürece, organizma bundan etkilenmemektedir. Bu denge bozulduğunda, oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizma oksidatif strese maruz kalır. Bunun sonucunda, hücresel metabolizma işleyişi bozulur, oluşan moleküller yıkım ile kalp, böbrek, karaciğer, mide, akciğer, beyin gibi birçok yaşamsal öneme sahip organlarda doku hasarı meydana gelir (51-54).



Şekil 8: Oksidan-Antioksidan denge (141)

2.3.1. Serbest Radikal Oluşum Kaynakları

Organizmada çoğu fizyolojik olay sırasında küçük miktarlarda serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bunlar antimikrobiyal savunma, sinyal iletimi gibi işlevlerde rol oynadıktan sonra antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilirler. Hücrenin tüm bileşenleri radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Özellikle mitokondriyal elektron transport zinciri endojen kaynaklı radikallerin oluştuğu en önemli yerdir (55-57). Mitokondriyal solunum zinciri sırasında NADH ve FADH₂ gibi indirgeyicilerin elektronlarının moleküler oksijene aktarılması olayında, solunum zinciri taşıyıcılarının indirgenmesi sonucu serbest radikal yapısına sahip ürünler oluşmaktadır (52,55,58). Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Elektron transport sistemlerinin aktivitesi sırasında sadece oksijen türevi radikaller meydana gelirken, ksenobiyotik metabolizması sırasında ek olarak yüksek toksik özelliğe sahip karbon merkezli radikaller de meydana gelebilir. Nükleer membran kaynaklı radikaller özellikle DNA hasarına neden olabilirler (58-61).

Peroksizomlar, önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit radikalini (O₂^{·-}) üretmeden, bol miktarda hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimine sebep olurlar. Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir (52,58).

Serbest radikal oluşumunun ekzojen kaynakları arasında sigara, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, alkol, güneş ışınları, stres, X-ışınları hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler en önemlileridir. Ağır bedensel aktivite de oksijen kullanımındaki artışla beraber radikal oluşumunu arttırmaktadır (52,62-68).

2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü sebebiyle hayati bir öneme sahiptir. Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur, fakat aerobik hücre metabolizmasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikallerine dönüşür. Enzim reaksiyonları da serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olmaktadır (69).

Oksijen molekülündeki aynı yönde spin atan iki elektrona sahip 2P son orbitali radikal oluşumunda önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde "singlet oksijen" oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse "oksijen radikali" elde edilir. Oluşan radikal ortaklaşmamış tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen molekülleri Tablo 4'te de görüleceği gibi iki ana başlık altında incelenmektedir (71,72).

Tablo 4: Oksijen kaynaklı serbest oksijen radikalleri (70)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO [·])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [·])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [·])	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ ^{·-})	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO [·])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])

2.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Vücutta serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasında bir homeostasis vardır. Bu denge oksidanlar lehine bozulduğunda, serbest radikaller karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olur (58,59,73).

2.3.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Tüm biyomoleküller serbest radikal atağına maruz kalır ancak bunların içinde lipitler en kolay etkilenenlerdir (59). Hücre, membranı ve diğer komponentleri ile serbest radikal atakları ve peroksidasyon için potansiyel bir hedeftir (74,75). Tüm biyolojik zarlar çoklu doymamış yağ asitleri ile amfipatik lipitler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur.

Lipit peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunu içeren kimyasal bir otokatalitik zincir reaksiyonu olup, lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanır (73,76-78).

Lipit hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre membran bütünlüğü yitirilir. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana gelmesine ve dolayısıyla iyon transportunu da etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilir. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (58,79,80).

2.3.3.2. Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre farklılık gösterir. Protein molekülünün ihtiva ettiği sülfidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler; aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmantasyonu, agregasyonu ve çapraz bağlanmalar şeklinde gerçekleşmektedir. (81).

2.3.3.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine sebep olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır (82-84).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında

hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. DNA'ya bağlı metal iyonları ile hidrojen peroksitin (H_2O_2) DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH^* radikalleri, OH^* radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH^* radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (85).

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (58). Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazı bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarına atak yapabilir ve mutasyonlara sebep olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıyken, Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici ajan olduğundan daha kolay tepkimeye girer (82).

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak 'hasarlı dal onarıcı enzimlerle' onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir. OH^* radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Örneğin bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya adeninin 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına OH^* radikali katılarak çeşitli ürünler oluşturarak çift dal kırıkları oluşmaktadır. Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır (86).

2.3.3.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glukozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra O_2 'i indirgeyerek $O_2^{\cdot-}$ anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer serbest radikallerin oluşumunu tetikler. Proteinlerin glikolizasyonu, glukozun proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glukoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda

oluşan glikolize proteinler ise, Cu ve Fe varlığında, O₂'ye elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar (87,88).

2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (58).

Etkilerini; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipit peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikaller ile reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar; intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (89).

Antioksidanlar etkilerini şimdiye kadar tespit edilen altı değişik mekanizma ile gösterirler.

- Moleküler oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltırlar.
- Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.
- Membran lipitlerini direkt etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir veya temizleyebilirler.
- Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların (OH, ferril ya da Fe⁺²/Fe⁺³/O₂ kompleksleri gibi) ve/veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler.
- Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GSH-Px ve Katalaz, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
- Zincir reaksiyonlarını kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler.

Antioksidan defans; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre haraplanmasının onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür (73). Bazı otoriteler antioksidan savunmayı komponentlerin enzim yapısında olup olmamasına bağlı olarak, Katalaz, SOD, GSH-Px, GSH-Rx, Glutasyon-S-Transferaz ve Mitokondriyal sitokrom oksidaz'ın rol aldığı antioksidan aktiviteleri enzimatik antioksidan savunma; Vitamin E, Vitamin C, glutasyon, ürik asit, bilirubin, albumin, polifenoller, karotenoidler, melatonin, seruloplazmin, transferrin ve laktoferrin gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini ise enzimatik olmayan antioksidan savunma olarak tanımlamışlardır (Tablo 5) (90). Öte yandan, antioksidanlara daha spesifik rollerin yüklendiği çalışmalarda, antioksidan savunma; sellüler, membransal ve extrasellüler olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (91).

Tablo 5: Antioksidan savunma sistemleri

ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Süperoksit Dismutaz (SOD) ✓ Katalaz ✓ Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ✓ Glutasyon-S-Transferaz ✓ Glutasyon Redüktaz (GSH-Rx) ✓ Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Askorbik Asit ✓ Glutasyon ✓ Vitamin E ✓ Karotenoidler ✓ Melatonin ✓ Polifenoller ✓ Seruloplazmin ✓ Ürat ✓ Transferrin ve Laktoferrin ✓ Albumin

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmaları, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Demirbaş Malzemeler

Kullanılan demirbaş malzeme listesi:

1. Laminar Flow Güvenlik Kabini Class 2 (Heraeus®)
2. CO2 inkübatörü (LaboTect®)
3. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal® 30 RF)
4. Otoanalizör (Abbott®)
5. Floresan inverted mikroskop (Olympus®, CK X41)
6. Işık mikroskobu (Olympus®)
7. Dijital Fotoğraf Makinesi (Olympus® C 5050 Z)
8. $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Buzdolabı (Profilo®)
9. -20°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific®, C54285)
10. -80°C derin dondurucu (Revco®)
11. Manyetik karıştırıcı (Hangping®, Variomag)
12. Vorteks (Nüve®, NM 110)
13. Pipet pompası (Boeco®)
14. Otomatik Pipetler (0,5-2 μl , 0,5-100 μl , 50-200 μl , 200-1000 μl , 1-5 ml) (Gilson®)
15. Hassas Terazi (Sartorius®)
16. Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF®)
17. Distile Su Cihazı (Nüve®)
18. Elektroforez (Biolab® Midi Cell)

19. Hot plate (Thermolyne®)
20. Su banyosu (Nüve®, BM 402)
21. pH metre (Hanna®, pH 211)
22. Lam, Lamel ve Cam Malzemeler (Isolab®)
23. Otoklav (Nüve®, OT 012)
24. Mikropleyt Okuyucu (BioTek®, ELx800)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Deneilerimizde kullanılan bütün kimyasal maddeler ve sarf malzemeler aşağıdaki şekildedir.

1. Asetilsalisilik asit (Sigma®)
2. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma®)
3. Hidrojen peroksit (Merck®)
4. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma®)
5. Sodyum klorür (Merck®)
6. MTT (Metil Tiyazol Tetrazolyum) (Sigma®)
7. Agaroz jel (Normal melting point) (Sigma®)
8. Agaroz jel (Low melting point) (Sigma®)
9. Potasyum klorür (Merck®)
10. Tris base (Sigma®)
11. Tris HCl (Sigma®)
12. Triton X-100 (Sigma®)
13. Sodyum hidroksid (Merck®)
14. Disodyum hidrojen fosfat (Merck®)
15. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck®)
16. Etidyum bromit (Sigma®)
17. Histopaque-1077 (Sigma®)
18. Tripan mavisi (Sigma®)
19. RPMI 1640 Medium (Sigma®)
20. Fetal Bovin Serum (Sigma®)
21. Gentamisin (Sigma®)
22. İmmersiyon Yağı (Merck®)

23. Pleyt (12-24-96 Kuyucuklu)
24. Hücre Kültür Flaskaları (25-75 cm²)
25. Pipet Uçları (0.1-10 µL, 1-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL)
26. Kurutma Kağıdı

3.3. ASA Konsantrasyonlarının Hazırlanması

ASA organik bir bileşik olduğundan organik bir çözücü olan Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürüldü. Öncelikle 10 mM 100 mL ASA stok solusyonu hazırlandı. Hazırladığımız bu stok solusyondan 5 mM, 4.5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM ve 1 mM olacak şekilde DMSO ile dilüe edilerek birer mililitre ASA konsantrasyonları hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar şırınga ucu sterilizasyon filtrelerinden geçirilerek steril edildi.

3.4. Hücre Kültürü Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerimizde kullanılacak cam malzemeler 8-10 saat süresince çamaşır suyunda bekletildi ve daha sonra deterjanlı suyla aynı süre muamele edildi. Deterjanlı suda bekletilen malzemeler yıkandı daha sonra çeşme altında bol su ile durularak bir gece distile suda bekletildi. Daha sonra etüvde kurutulan cam malzemelerin ağızları alüminyum folyo ile kapatılarak, 180 °C'lik etüvde bir saat steril edildi. Otomatik pipetler ise pipet kutuları içerisinde aynı şartlarda steril edildi. Sterilizasyona uygun, yüksek ısıya dirençli pipet uçları, ependorf ve tüp sporu gibi plastik malzemeler ise otoklavda 121 °C'de 3 atm basınçta 15-25 dakika steril edildi.

Ticari olarak sağlanan hücre kültür medyumu, sitotoksisite ve genotoksisite deneylerinde kullanılacak solüsyonlar ise 0.22 mikron gözenek büyüklüğü olan şırınga ucu filtreler kullanılarak steril edildi. Hücre kültürü laboratuvarı içerisinde bulunan bütün cihazlar ve bütün yüzeyler her hafta periyodik olarak % 70 alkol çözeltisi ile silindi.

Hücre kültür laboratuvarının kullanılmadığı zamanlarda ve içeriye girilmeden en az yarım saat önce biyogüvenlik kabini çalıştırılarak ve UV lamba kullanılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Ayrıca laboratuvar içerisinde kullanılacak, önlük, eldiven ve galoş gibi gereçlerde UV lambanın açık olduğu zamanlarda sterilizasyonu sağlandı.

3.5. Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu ve Hücre Kültürü

Bu çalışmada, fizik muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmayan, klinik ve laboratuvar tetkiklerinde lokal veya sistemik bir hastalık tespit edilmeyen, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir kanser risk faktörü taşımayan, vücut kitle indeksi 24.16 olan, 28 yaşında gönüllü bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde 10 ml'lik heparinize edilmiş tüplere venöz kan örneği alındı. Boş steril bir tüp içine 1 ml Histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 1 ml taze heparinize kan yavaşça konuldu ve bu işlem 10 ayrı tüpe uygulandı. Tüpler 25°C ve 2100 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabakada lökositler, eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü histopaque solüsyonu ve en üst tabakada ise plazma mevcuttu. Orta tabakada biriken mononükleer lenfositler pipet yardımıyla alınıp bir ml PBS (fosfat tampon solüsyonu) tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lenfosit pelleti elde edildi.

3.6. Mononükleer Lökositlerin Sayımı

Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli lökosit hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından thoma lamı üzerine yaydılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına yayılması sağlandı. Bu işlem yapılırken lam ve lamel arasında kabarcık olmamasına özen gösterildi. Hemositometre üzerinde 25 mm²'ye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formülden toplam lökosit hücre sayısı belirlendi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{10^4 \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}}{(\text{Sabit katsayı}) (\text{Hacim})}$$

Toplam hücre sayısı bilinen lökosit pelleti hücre kültür flaskına aktarılarak 10 ml (%80 RPMI 1640 medium ve %20 fetal bovine serum (FBS) ve 5 µg/mL gentamisin) hücre kültür çözeltisi oluşturuldu.

3.7. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma grubu olarak Tablo 6’da da görüleceği gibi; 5 mM, 4.5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM ve 1 mM steril ASA konsantrasyonları, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DMSO grubu oluşturuldu. ASA içermeyen hücre kültür süspansiyonu (-) negatif kontrol grubu, toplam kuyucuk volümünde 100 µM H₂O₂ içeren grup ise (+) pozitif kontrol grubu olarak belirlendi. ASA çözücüsü olarak bulunan DMSO’nun hücrelere zarar verip vermediğini tespit etmek için ise toplam kuyucuk volümünde <%5 DMSO olan, ASA içermeyen DMSO grubu oluşturuldu.

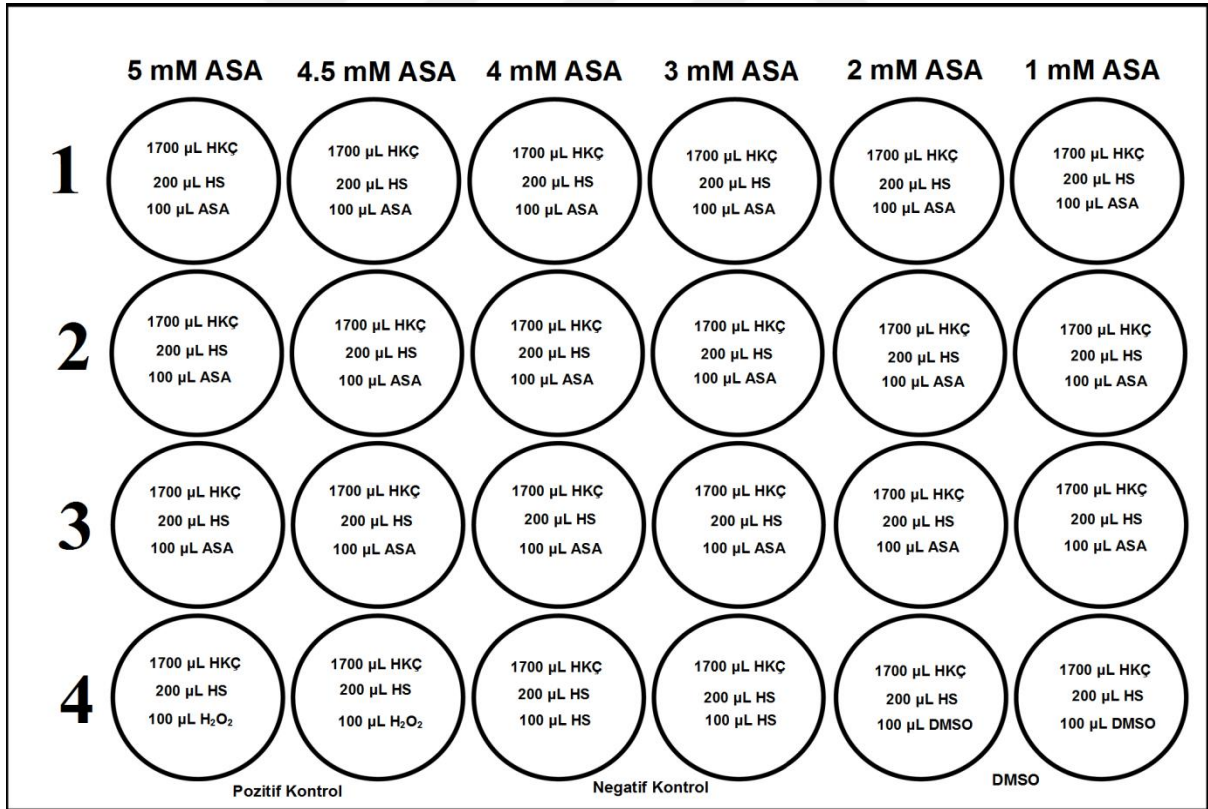
Tablo 6: Çalışma gruplarının oluşturulması

Gruplar	Hücre Süspansiyonu	ASA	H ₂ O ₂	DMSO
5 mM ASA	✓	✓		
4.5 mM ASA	✓	✓		
4 mM ASA	✓	✓		
3 mM ASA	✓	✓		
2 mM ASA	✓	✓		
1 mM ASA	✓	✓		
Pozitif Kontrol	✓		✓	
Negatif Kontrol	✓			
DMSO	✓			✓

3.8. Hücrelerin İnkübasyonu

Kuyucuk volümü 3 mL olan 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her bir kuyucuğuna 1700 µL hücre kültür çözeltisi (%80 RPMI 1640 Medium, %20 Fetal Bovine Serum (FBS), 5 µg/mL Gentamisin) ve 200 µL 3×10^5 /mL lenfosit olacak şekilde ilave edildi. Bu karışımın üzerine toplam volümdeki konsantrasyonu 5 mM, 4.5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM ve 1 mM olacak şekilde ASA konsantrasyonlarından üç tekrarlı olarak 100 µL, negatif kontrol olarak iki tekrarlı olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu, toplam volümde konsantrasyonu <%5 DMSO olacak şekilde iki tekrarlı DMSO ve toplam volümdeki konsantrasyonu 100 µM olacak olan H₂O₂ solusyonundan da yine iki tekrarlı olarak 100 µL eklenir. Çalışma protokolünün özetini gösteren Tablo 6'daki pleytten 6 adet hazırlandı. Deney protokolü Şekil 9'da özetlenmiştir.

Şekil 9: Deney protokolü



HKÇ: Hücre Kültür Çözeltisi

HS: Hücre Süspansiyonu

Herbir kuyucukta toplam volümü 2 mL olan 6 adet hücre kültür pleyti 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem şartları oluşturulan karbondioksit inkübatöründe 1, 2, 3, 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyondan sonra 1. pleytin tüm kuyucuklarındaki karışımlar ayrı ayrı eppendorf tüplere alındı ve 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatantı Toplam antioksidan seviye, Toplam oksidan seviye ve Oksidatif stres indeksi ölçümü için ayrıldı. Aynı işlemler 2., 3., 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 2., 3., 4., 5. ve 6. pleytlere de uygulandı. Santrifüj sonrası eppendorflarda kalan pelletler ise DNA Hasarı tespiti için kullanıldı.

3.9. Kullanılan Yöntemler ve Çalışma Prensipleri

3.9.1. *In Vitro* Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksosite Testi (MTT)

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon ve sitotoksosite testlerinde yaygın olarak 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak suda çözünmeyen formazan (mor) kristallerine dönüştürmesi ve oluşan renkli kristallerin DMSO ile çözülerek, çözeltinin 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (92).

ASA konsantrasyonları, negatif kontrol ve DMSO grubundan oluşan hücre kültür çözeltileri sekiz tekrar halinde 96 kuyucuklu hücre kültür pleytine eklendi, 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakıldı. PBS tamponu içerisinde 5 mg/ml olacak şekilde MTT stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisi bir filtreden geçirilip sterilize edildi ve çözünmeyen MTT partiküllerinden arındırıldı. Hazırlanan MTT çözeltisinden, son konsantrasyonu 100 µl/ml olacak şekilde inkübasyon süresi biten pleyttteki tüm kuyucuklara eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üstte kalan süpernatant atıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml DMSO eklenip 10 dakika karıştırılarak mor renkli kristallerin çözünmesi sağlandı. Sonuçlar 570 nm'de pleyt okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve negatif kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

3.9.2. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi

Yöntemin Prensipleri: Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması

bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottür. Mononükleer lökosit DNA hasarı, Sigh ve ark. tarafından geliştirilen alkali tek hücre jel elektroforez (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı (93). Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklıklara göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler agaroz jele yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmayacak şekilde yürürler. Oysa DNA zincirinde herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Elektroforezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

3.9.2.1. Slaytların Hazırlanması ve Hücreler : %1'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanıp eritildikten sonra 80 µl alınarak kenarları rodajlanmış lamalar üzerine damlatıldı. Lamların üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lameller kaldırıldı. Hazırlanan lamalar nemli ortamda bekletildi. Bu esnada hücrelerin inkübasyonu aşamasındaki çalışma protokolü oluşturulan ve 1 saatlik inkübasyonu tamamlanan 1. pleyt üzerindeki tüm kuyucuk içerikleri eppendorf tüplere alındı ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlemler 2., 3., 24., 48. ve 72. saatte inkübasyonu biten 2., 3., 4., 5. ve 6. pleytlere de uygulandı. Santrifüj sonrası pellet PBS tamponu ile mm³'te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,6'lık low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra lamel ile kapatılarak ± 4°C'de 5 dakika bekletilir. Ardından lameller kaldırılarak slaytların hazırlanma işlemi tamamlandı.

3.9.2.2. Lizis aşaması: Hücre zarlarının parçalanması için önce 2,5 M Sodyum klorür, 100 mM EDTA ve 10 mM trizma base distile suda çözülerek stok lizing solüsyonu hazırlandı (pH=10). Çalışmadan hemen önce stok lizing solüsyonuna %1 oranında triton X-100 ve %10 oranında DMSO eklendikten sonra slaytlar 50 dakika soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

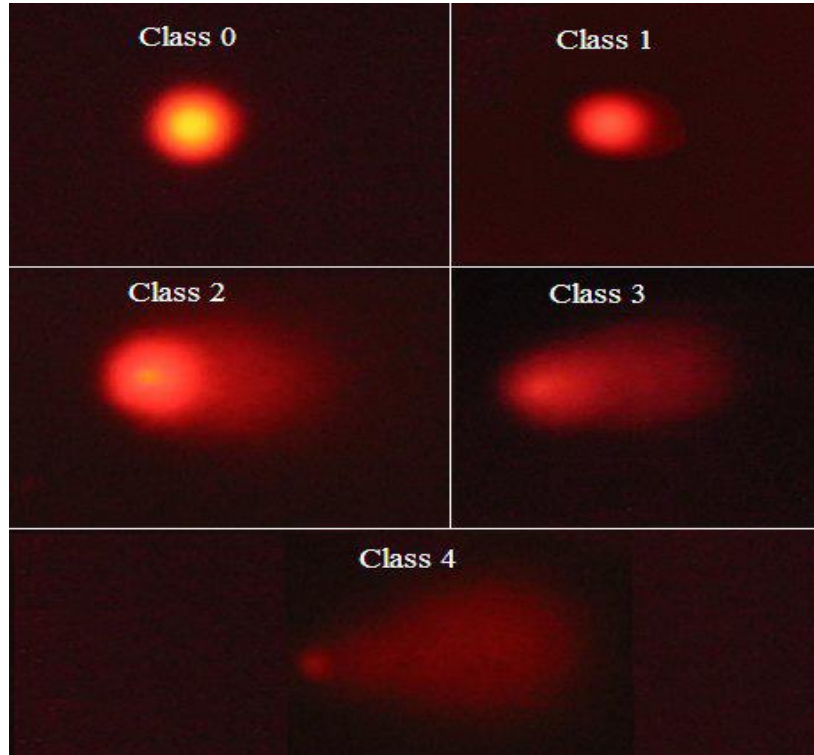
3.9.2.3. Elektroforez tamponu ve Yürütme: Lizis aşamasından sonra slaytlar elektroforez işlemine tabi tutulacaktır. Alkali elektroforez tamponu 1mM Na₂EDTA ve 300 mM

NaOH'tan oluşmaktadır (pH <13). Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika inkübasyona bırakılır. Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

3.9.2.4. Nötralizasyon: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) ile yıkandı.

3.9.2.5. Boyama: Nötralizasyon işleminden sonra boyama yapılarak cometler sayılır veya jel oda sıcaklığında kurutularak slaytlar nemli ortamda en fazla bir hafta depolanabilir. Boyama işlemi için floresan bir boya olan etidyum bromid boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme işlemi için DNA'lar hasar düzeyine göre 5 sınıfa (0, 1, 2, 3 ve 4) (Şekil 10) ayrıldı.

Hiç hasar bulunmayan DNA'lar class 0, maksimum hasar olan DNA'lar class 4 olarak değerlendirildi. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermekte idi. Hasar birimi olarak "Arbitrary Unit" (AU) kullanıldı (94-98).



Şekil 10: DNA hasarlarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri

3.9.3. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

ASA konsantrasyonları, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DMSO grubunun 1., 2., 3., 24., 48. ve 72. saat inkübasyonu tamamlandıktan sonra kuyucuk içerikleri eppendorflara ayrılıp santrifüj edilmişti. Santrifüj sonrası ayrılan süpernatantta toplam oksidan seviye (TOS) düzeyi, Erel tarafından geliştirilen metodla Rel Assay® marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equivalent/L olarak ifade edilir (99).

3.9.4. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

ASA konsantrasyonları, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DMSO grubunun 1., 2., 3., 24., 48. ve 72. saat inkübasyonu tamamlandıktan sonra kuyucuk içerikleri eppendorflara ayrılıp santrifüj edilmişti. Santrifüj sonrası ayrılan süpernatantta toplam antioksidan seviye (TAS) düzeyi, Erel tarafından geliştirilen metodla Rel Assay® marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS[•] katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (100).

3.9.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken TAS düzeyleri ile TOS düzeylerinin birimleri eşitlenir (101,102). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

$$\text{OSİ (AU)} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.}}{\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}} \times 100$$

3.10. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların ortalamaları arasındaki farkın önemi Student's t testi ile karşılaştırılmıştır. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile araştırılmıştır. $p < 0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

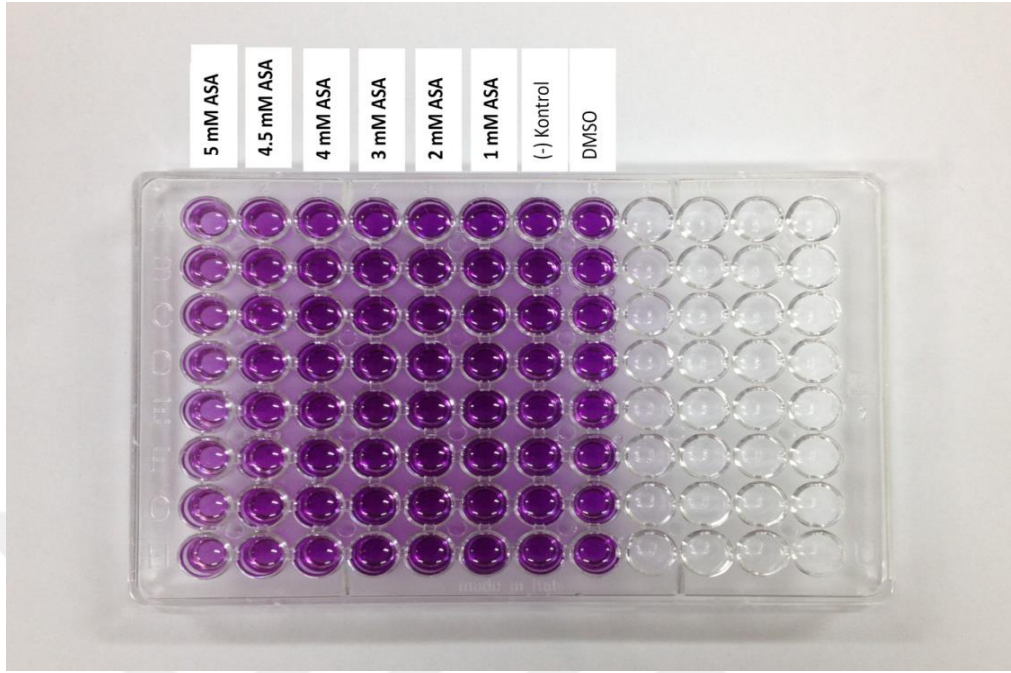


4. BULGULAR

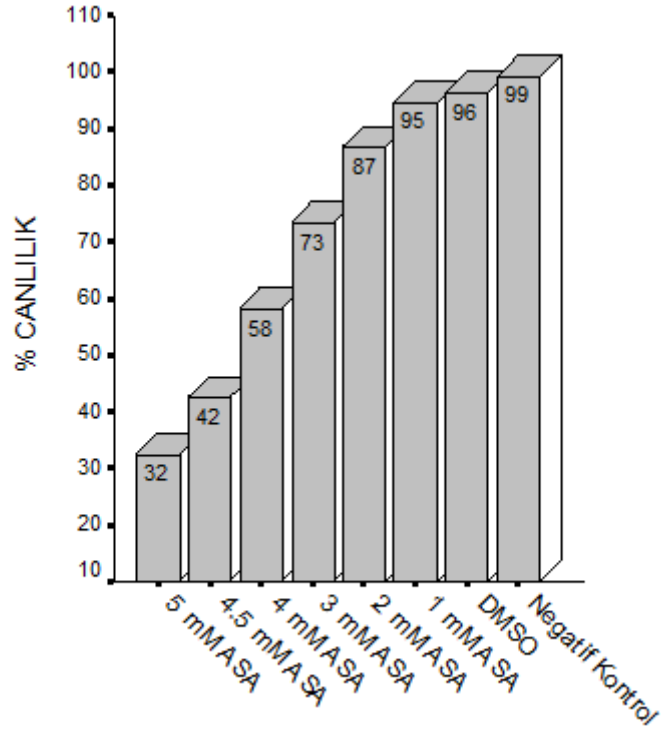
Farklı ASA konsantrasyonları içeren gruplar, negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu ve DMSO grubu olarak tasarlanan çalışmamızda MTT, Toplam Antioksidan Seviye, Toplam Oksidan Seviye, Oksidatif Stres İndeksi ve DNA hasarı ölçümleri gereç ve yöntemler bölümünde belirtilen şekillerde ve en az üç tekrarlı yapılarak çalışıldı.

4.1. *In Vitro* Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksikite Testi (MTT) Bulguları

ASA'nın farklı konsantrasyonlarının, negatif kontrol grubunun ve DMSO'nun lenfositler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. MTT testi sonucunda elde edilen verilerle, hücre proliferasyonunun konsantrasyona bağlı eğrisinden hücrelerin %50'sinin canlı olduğu konsantrasyon (IC_{50}) hesaplanmıştır. Bizim verilerimize göre 1 mM ASA'nın lenfosit hücreleri üzerinde neredeyse hiç sitotoksik etkisi yokken artan konsantrasyonlarla beraber bu etkinin arttığı görülmektedir (Şekil 12). MTT analizlerine göre kontrol grubuna göre %50 absorbans azalması ile belirlenen toksik doz düzeyi 4.3 mM olarak hesaplanmıştır. 4.3 mM konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda ASA'nın lenfosit hücreleri üzerinde ağır sitotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır. MTT deneylerimiz sonucunda gözlenen pleytin görüntüsü Şekil 11'de görülmektedir.



Şekil 11: MTT Deneyi Pleyt görüntüsü



Şekil 12: MTT ile yapılan canlılık testinde artan farklı ASA konsantrasyonlarının, DMSO ve negatif kontrolün lenfositler üzerindeki sitotoksik etkileri

4.2. TAS, TOS ve OSİ Bulguları

ASA'nın farklı konsantrasyonlarının, negatif kontrol grubunun, pozitif kontrol grubunun ve DMSO'nun *in vitro* lenfosit hücre kültürü ortamında 1. saat, 2. saat, 3. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saat'lik inkübasyon sonucu TAS, TOS, OSI düzeyleri üzerine olan etkilerinin analizi Tablo 7, 8 ve 9'te gösterilmektedir.

Tablo 7: ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun TAS Düzeyleri

G R U P	TAS, mmol trolox Equiv./L					
	İnkübasyon Süresi					
	1.Saat	2.Saat	3.Saat	24.Saat	48.Saat	72. Saat
5 mM ASA	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01
4.5 mM ASA	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01
4 mM ASA	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
3 mM ASA	0,37 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,00
2 mM ASA	0,38 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,01
1 mM ASA	0,42 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,00	0,35 ± 0,01
(-) Kontrol	0,42 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,02
DMSO	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,36 ± 0,01
(+) Kontrol	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,00
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

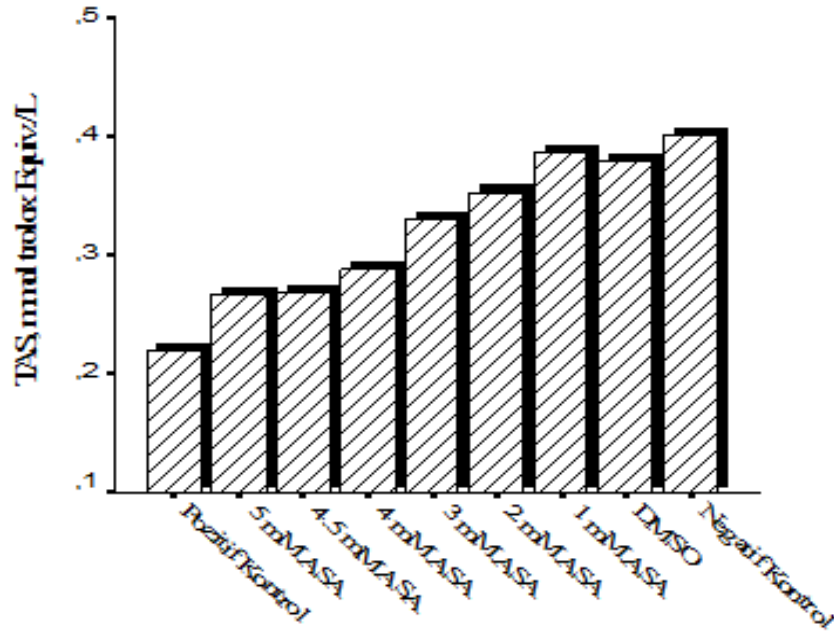
Ortalama ± Standart Sapma

ASA konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol ve DMSO gruplarının TAS düzeyleri tablodan da görüleceği gibi zamana bağlı olarak azalmaktadır. 1mM konsantrasyonda ASA verilen grup diğer ASA maruziyetine bırakılan gruplara göre tüm zamanlarda toplam antioksidan düzeyi açısından yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

1 mM ASA grubu ile negatif kontrol grubu arasında ilk üç saat inkübasyon süresince TAS düzeyi açısından herhangi bir farklılık gözlenmezken 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra 1 mM ASA grubunun TAS düzeyi negatif kontrol grubuna düşük ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

ASA çözücüsü olarak çalışmamızda yer alan DMSO'nun TAS düzeyi, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün inkübasyon sürelerinde genel olarak düşüktü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Bu sonuç çözücü olarak bulunan DMSO'nun antioksidan düzey açısından herhangi bir değişikliğe sebebiyet vermediğini göstermektedir.

Tablo 7'de görüleceği gibi pozitif kontrol grubu ($100 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$) ile negatif kontrol karşılaştırıldığında negatif kontrol grubunun TAS düzeyi tüm zamanlarda pozitif kontrol grubundan daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). Aynı şekilde tüm ASA konsantrasyonları, negatif kontrol ve DMSO grubunun TAS düzeyleri tüm zamanlarda pozitif kontrol grubundan daha yüksekti (Şekil 13).



Şekil 13: Farklı konsantrasyonlardaki ASA, pozitif/negatif kontrol ve DMSO gruplarının TAS düzeyleri

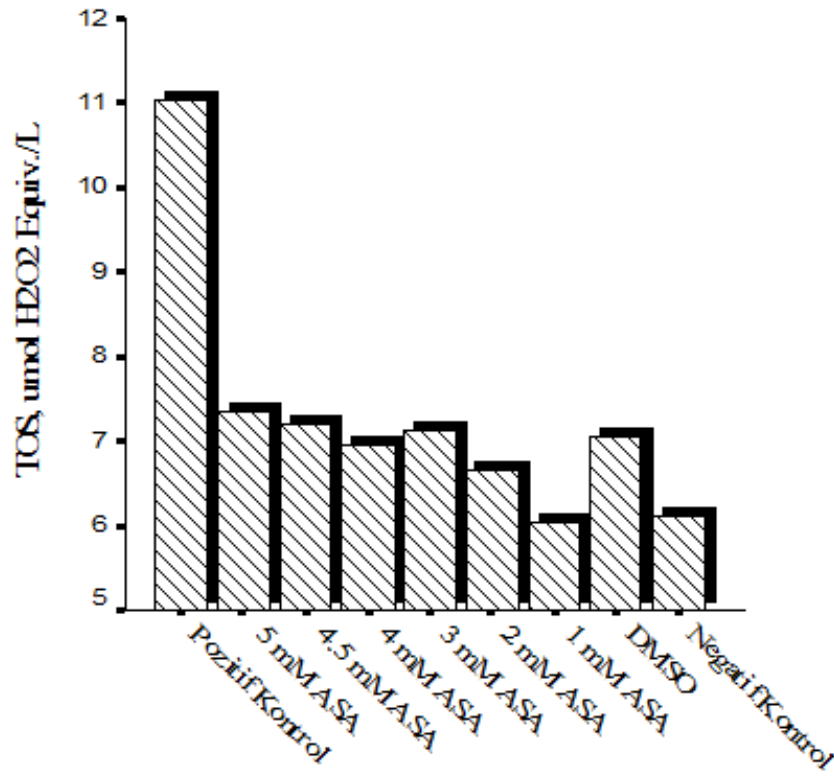
Tablo 8: ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun TOS Düzeyleri

G R U P	TOS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L					
	İnkübasyon Süresi					
	1.Saat	2.Saat	3.Saat	24.Saat	48.Saat	72. Saat
5 mM ASA	5,4 ± 1,11	5,73 ± 1,74	6,3 ± 0,89	7,3 ± 1,00	8,9 ± 1,56	10,2 ± 0,69
4.5 mM ASA	5,8 ± 1,62	6,0 ± 1,67	6,2 ± 1,29	7,4 ± 1,13	8,3 ± 1,35	9,3 ± 1,03
4 mM ASA	6,29 ± 0,95	6,0 ± 0,94	5,0 ± 1,58	7,0 ± 1,50	7,9 ± 0,78	9,2 ± 0,93
3 mM ASA	5,85 ± 0,46	7,3 ± 1,16	6,2 ± 1,01	5,4 ± 1,08	8,3 ± 1,11	9,3 ± 1,25
2 mM ASA	6,50 ± 0,44	5,7 ± 0,49	6,3 ± 1,02	5,4 ± 1,18	7,6 ± 1,24	8,2 ± 1,51
1 mM ASA	6,10 ± 1,00	5,7 ± 1,33	5,04 ± 0,52	5,8 ± 1,73	6,1 ± 1,02	7,4 ± 0,92
(-) Kontrol	4,53 ± 0,69	4,4 ± 1,01	4,5 ± 0,75	6,4 ± 0,80	8,0 ± 0,81	8,5 ± 1,07
DMSO	4,83 ± 0,70	6,59 ± 0,99	5,92 ± 1,18	7,8 ± 0,52	8,7 ± 1,17	8,3 ± 1,00
(+) Kontrol	10,2 ± 0,75	8,9 ± 0,35	11,2 ± 1,56	11,1 ± 1,96	11,2 ± 2,68	13,4 ± 0,89
p	<0,001	0,012	<0,001	0,001	0,042	<0,001

Ortalama ± Standart Sapma

ASA konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol ve DMSO gruplarının TOS düzeyleri zamana bağlı olarak genel anlamda değişiklik göstermektedir. 1. 2. ve 3. saat inkübasyon sonunda bütün grupların TOS düzeylerinde artan ve azalan değişiklikler olmakta fakat istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubu tüm zamanlarda diğer bütün grupların TOS düzeylerinden yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Tüm gruplarda 72. saat sonundaki TOS düzeyleri 1. saat sonundaki TOS düzeylerinden yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). DMSO grubu ile negatif kontrol grubu karşılaştırıldığında DMSO grubunun TOS düzeyi negatif kontrol grubunun TOS düzeyinden tüm zamanlarda yüksek bulunmuştur, fakat genel anlamda istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Her ne kadar istatistiksel açıdan fark bulunmasa da bu bulgu ASA çözücü olarak kullanılan DMSO'nun TOS düzeylerini yükseltme yönünde etki gösterdiğini işaret etmektedir.

ASA konsantrasyonlarının TOS düzeyleri kendi aralarında değerlendirildiğinde tüm zamanlarda en düşük TOS düzeyi genel anlamda 1 mM ASA konsantrasyonudur. En yüksek ASA konsantrasyonu olan 5 mM ASA, ilk 2 saatlik inkübasyon sürelerinde diğer ASA konsantrasyonlarına göre daha düşüktür fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). 5 mM ASA konsantrasyonunun 1. ve 2. saat inkübasyon sonundaki TOS düzeyinin düşüklüğü reaktif oksijen türleri süpürücü özelliğine sahip olduğunu düşündürmektedir. Bütün ASA konsantrasyonları, negatif kontrol ve DMSO grubunun TOS düzeyleri tüm zamanlardaki pozitif kontrol grubundan daha düşüktü (Şekil 14).



Şekil 14: Farklı konsantrasyonlardaki ASA, pozitif/negatif kontrol ve DMSO gruplarının TOS düzeyleri

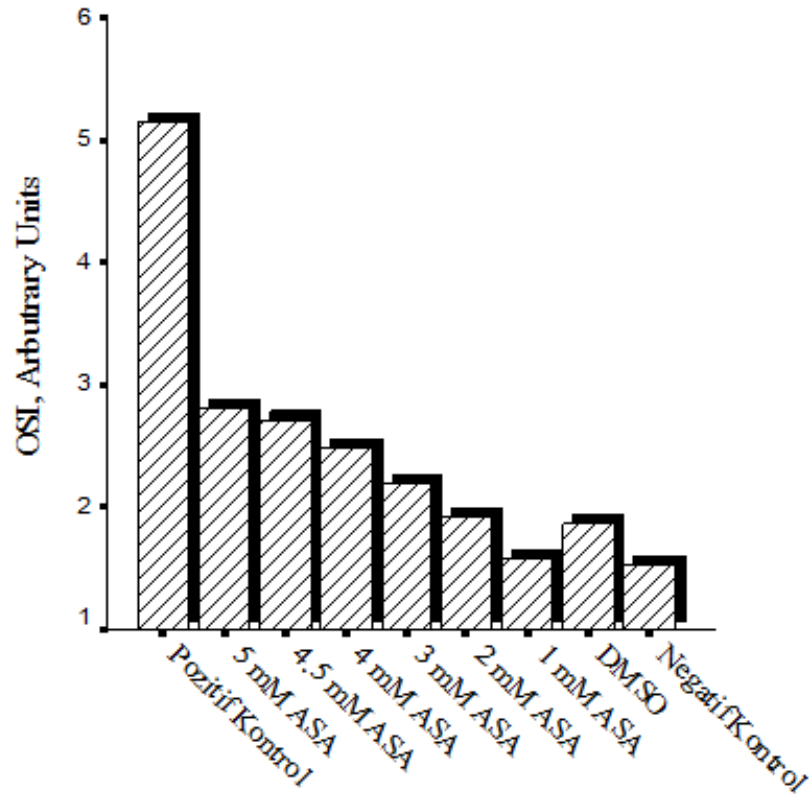
Tablo 9: ASA, Negatif kontrol, Pozitif kontrol ve DMSO'nun OSİ Düzeyleri

G R U P	OSİ, Arbitrary Units					
	İnkübasyon Süresi					
	1.Saat	2.Saat	3.Saat	24.Saat	48.Saat	72. Saat
5 mM ASA	1,9 ± 0,24	1,9 ± 0,60	2,2 ± 0,17	2,8 ± 0,45	3,5 ± 0,73	4,1 ± 0,40
4.5 mM ASA	2,1 ± 0,69	2,1 ± 0,64	2,1 ± 0,38	2,8 ± 0,56	3,4 ± 0,63	3,5 ± 0,47
4 mM ASA	1,9 ± 0,36	1,9 ± 0,26	1,6 ± 0,51	2,5 ± 0,59	3,1 ± 0,41	3,6 ± 0,22
3 mM ASA	1,5 ± 0,03	2,1 ± 0,40	1,7 ± 0,20	1,7 ± 0,38	2,8 ± 0,47	3,0 ± 0,40
2 mM ASA	1,6 ± 0,09	1,5 ± 0,13	1,6 ± 0,26	1,5 ± 0,36	2,3 ± 0,49	2,7 ± 0,49
1 mM ASA	1,4 ± 0,19	1,4 ± 0,39	1,3 ± 0,11	1,4 ± 0,43	1,7 ± 0,31	2,0 ± 0,22
(-) Kontrol	1,0 ± 0,22	1,0 ± 0,26	1,1 ± 0,15	1,6 ± 0,25	2,0 ± 0,20	2,2 ± 0,16
DMSO	1,2 ± 0,11	1,7 ± 0,28	1,5 ± 0,54	2,0 ± 0,11	2,3 ± 0,29	2,2 ± 0,18
(+) Kontrol	4,1 ± 0,67	3,7 ± 0,36	4,8 ± 0,57	5,5 ± 0,94	5,3 ± 1,48	7,0 ± 0,71
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Ortalama ± Standart Sapma

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen OSİ, TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen hesaplamalı bir parametredir. Tüm grupların OSİ düzeyleri incelendiğinde zamana bağlı olarak artmaktadır. Pozitif kontrol grubu tüm zamanlarda diğer gruplara göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). DMSO grubu ile negatif kontrol grubu karşılaştırıldığında DMSO grubunun OSİ düzeyi tüm zamanlarda negatif kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Bütün ASA grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında en düşük OSİ düzeyinin tüm zamanlarda 1 mM ASA grubu olduğu tespit edilmiştir.

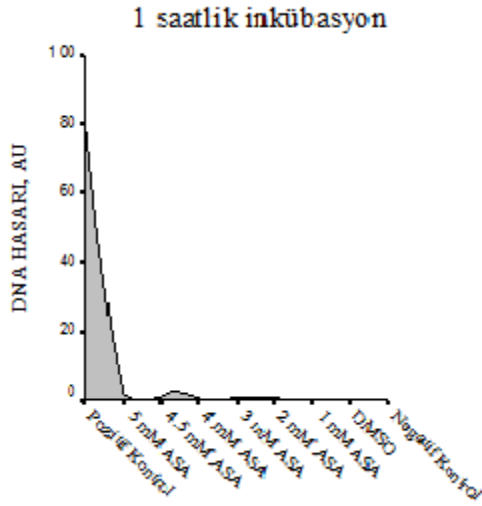
Negatif kontrol grubu ile 1 mM ASA konsantrasyonu karşılaştırıldığında ilk üç saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda negatif kontrol grubunun OSİ düzeyi, 1 mM ASA grubunun OSİ düzeyinden daha düşük bulunmuş fakat istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak uzun süreli inkübasyonlarda (24., 48. ve 72. saatler) negatif kontrol grubunun OSİ düzeyinin 1 mM ASA grubunun OSİ düzeyinden daha yüksek olduğu gözlenmiş fakat istatistiksel bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bu bulgu düşük doz ASA'nın uzun dönemli inkübasyonunda serbest radikal hasarına karşı koruyucu özelliği sahip olduğunu düşündürmektedir. Bütün ASA konsantrasyonları, negatif kontrol ve DMSO grubunun OSİ düzeyleri, tüm zamanlarda pozitif kontrol grubunun OSİ düzeyinden daha düşük olduğu bulundu (Şekil 15).



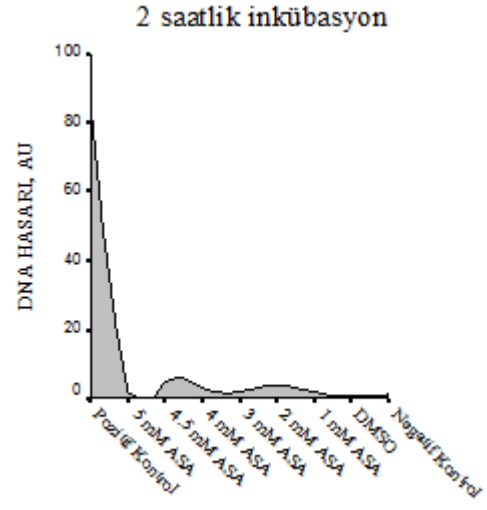
Şekil 15: Farklı konsantrasyonlardaki ASA, pozitif/negatif kontrol ve DMSO gruplarının OSİ düzeyleri

4.3. DNA Hasarı Bulguları

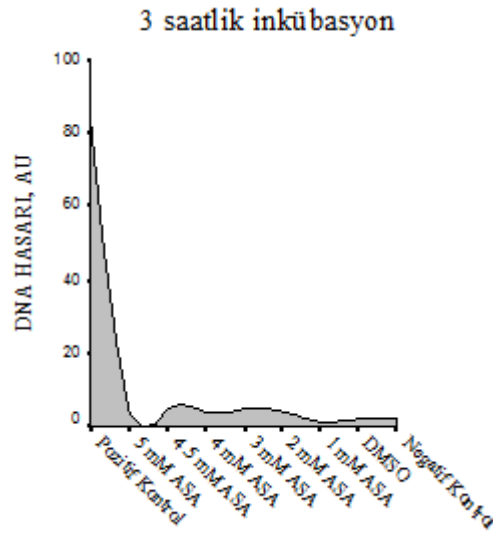
Farklı ASA konsantrasyonları içeren gruplar, negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu ve DMSO grubu olarak tasarlanan çalışmamızda genotoksik etki düzeyini gösteren DNA hasarı düzeyleri inkübasyon sürelerine göre aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 16: 1. Saat DNA hasarı Sonuçları



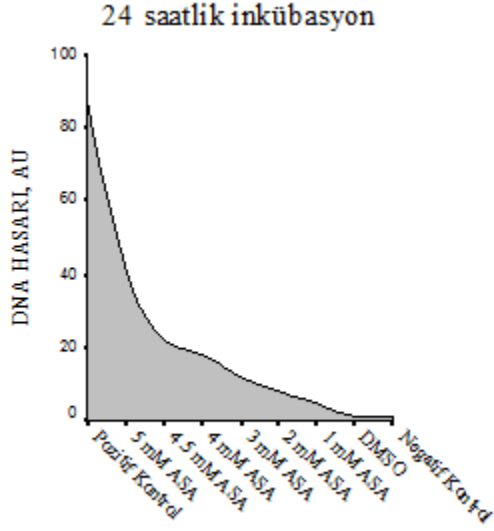
Şekil 17: 2. Saat DNA hasarı Sonuçları



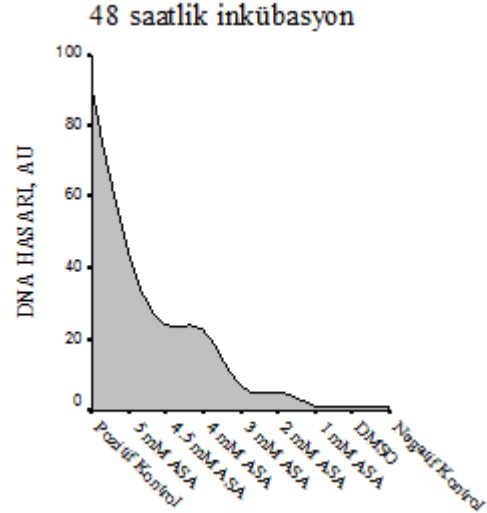
Şekil 18: 3. Saat DNA hasarı Sonuçları

ASA konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol ve DMSO gruplarının DNA hasarı düzeyleri şekillerden de görüleceği gibi ilk üç saatlik inkübasyon sürelerinde çok fazla değişiklik göstermemektedir. 100 μ M H₂O₂ içeren Pozitif kontrol grubu birinci, ikinci ve üçüncü inkübasyon süreleri sonunda diğer gruplara göre DNA hasarı seviyesi açısından

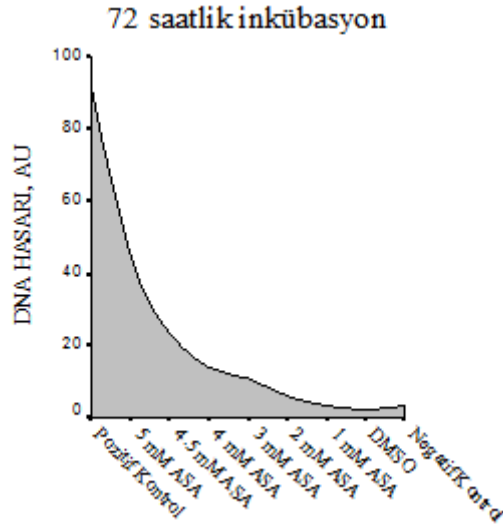
oldukça yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). ASA konsantrasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde ilk üç saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük DNA hasarı düzeyi 1 mM ASA konsantrasyonudur.



Şekil 19: 24. Saat DNA Hasarı Sonuçları



Şekil 20: 48. Saat DNA Hasarı Sonuçları



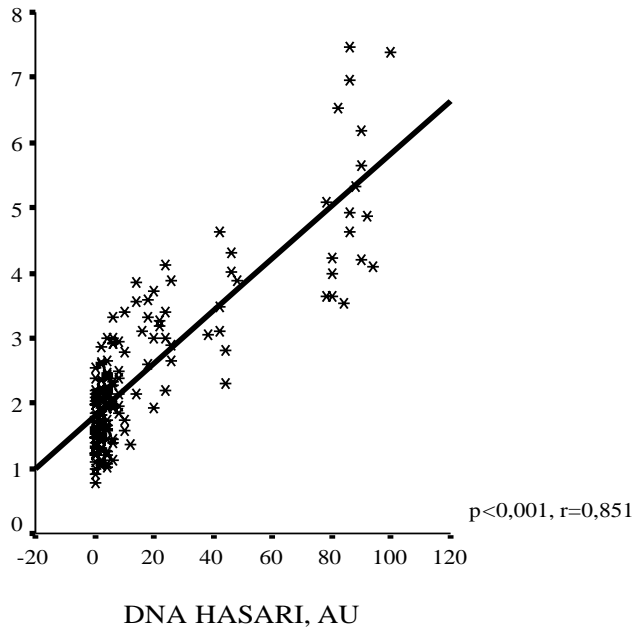
Şekil 21: 72. Saat DNA Hasarı Sonuçları

Farklı ASA konsantrasyonları, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DMSO grubunun uzun süreli inkübasyonunda, ASA konsantrasyonlarında inkübasyon süresine paralel olarak DNA hasar düzeyi artmaktadır. Pozitif kontrol grubunun DNA hasar düzeyi, ilk üç saatlik inkübasyon periyodunda belirgin bir artış göstermemişken, 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde zamana bağlı olarak artış göstermiş ve 72. saat inkübasyon süresi sonunda en yüksek düzeye ulaşmıştır.

Uzun süreli inkübasyonlarda, ASA konsantrasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde tüm zamanlarda en düşük DNA hasar düzeyi 1 mM ASA olarak bulunmuştur.

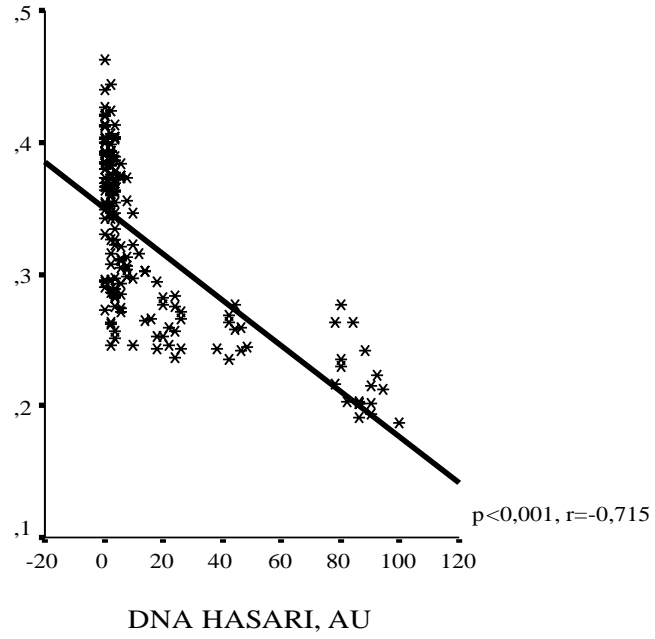
DMSO grubu ile negatif kontrol grubu DNA hasar düzeyi açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında hem kısa süreli inkübasyonda hemde uzun süreli inkübasyonda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Bu bulgu DMSO'nun (<%5 DMSO) lenfosit hücreleri üzerinde kısa ve uzun süreli inkübasyonunda DNA hasarı düzeyinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

DNA hasar düzeyi ile OSİ düzeylerinin korelasyonu pearson korelasyon analizi ile araştırılmıştır (Şekil 22). Bütün inkübasyon sürelerinde ve bütün gruplarda, OSİ düzeyleri ile DNA hasar düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0.001$, $r=0.851$). Bütün gruplarda OSİ düzeyi artarken buna paralel olarak DNA hasar düzeyi de artmakta veya bu durumun tam tersi olmaktadır.



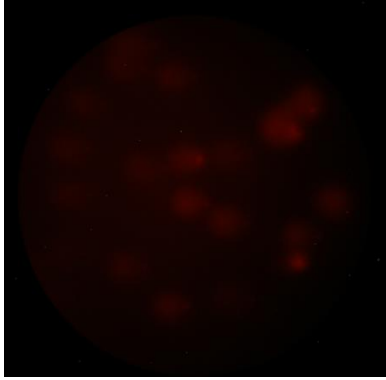
Şekil 22: Oksidatif stres indeksi ile DNA hasarı arasındaki pearson korelasyon analizi.

Şekil 23’de DNA hasar düzeyi ile TAS düzeylerinin tüm zamanlardaki korelasyonu gösterilmektedir. Bütün inkübasyon sürelerinde ve bütün gruplarda TAS düzeyleri ile DNA hasar düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($p<0.001$, $r=-0.715$). Bütün gruplarlar bir arada değerlendirildiğinde TAS düzeyi artarken, DNA hasarı azalmakta, TAS düzeyi azalırken de DNA hasar düzeyi artmaktadır.

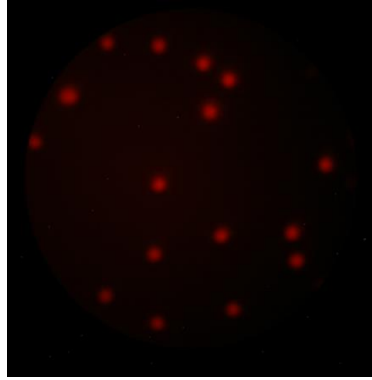


Şekil 23: Total Antioksidan Seviye ile DNA hasarı arasındaki pearson korelasyon analizi.

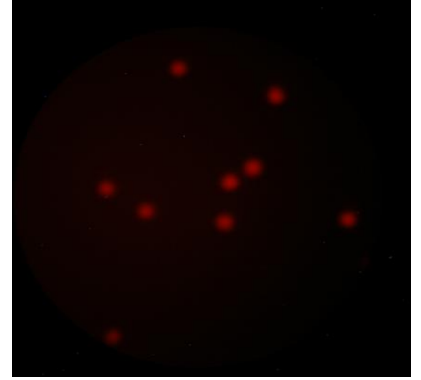
Şekil 24: 24 saatlik inkübasyon sonrası görülen örnek DNA hasarı görüntüleri



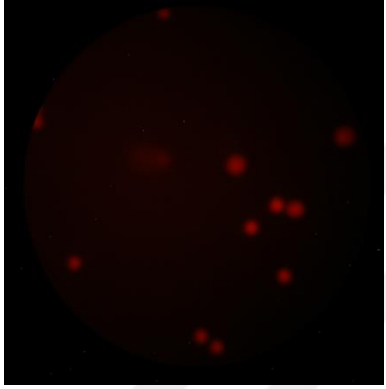
Pozitif Kontrol



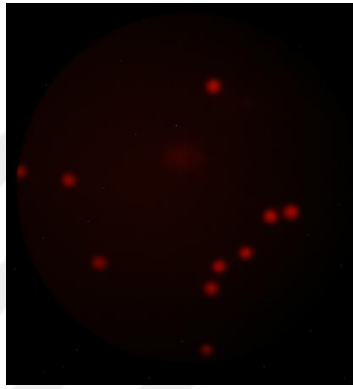
Negatif Kontrol



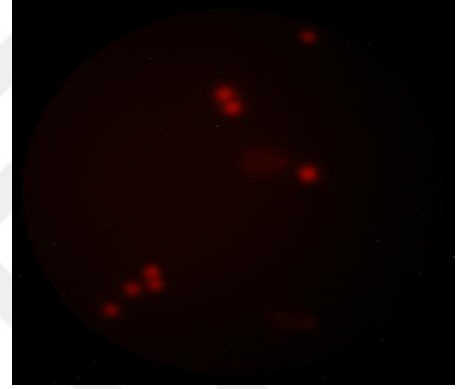
DMSO



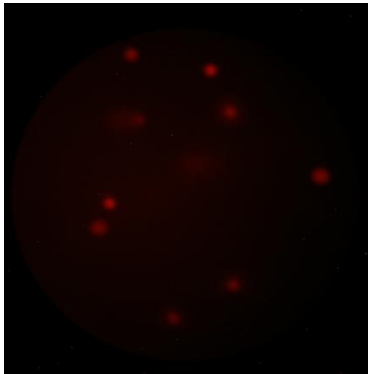
1 mM ASA



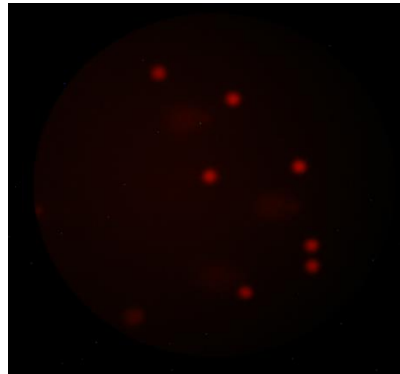
2 mM ASA



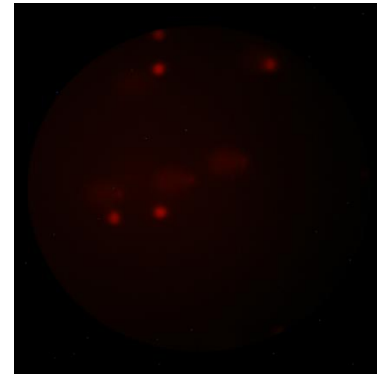
3 mM ASA



4 mM ASA



4,5 mM ASA



5 mM ASA

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağrı kesici ve ateş düşürücü amaçlı kullanılan aspirin, ilk defa M.Ö. yaşamış uygarlıklar tarafından kullanılmıştır. Aspirinin ham maddesi olan salisilik asit ve türevlerinin bazı bitkilerin gövde ve kabuğunda bulunması ve bu bitkileri çiğnemenin baş ağrısı ve ateşli hastalıkları iyileştirici etkisinin olduğuna inanılmaktaydı. Söğüt ağacından izole edilen aspirin 1800'lü yılların sonlarına doğru ilk defa asetilsalisilik asit (ASA) şeklinde üretilmiştir. Aneljezik, antiinflamatuvar ve antipiretik özellikleri aspirinin tüm dünyada hızla yayılmasına yol açmıştır.

Aspirin, salisilat ailesinin üyesi olup, mide ve bağırsak tarafından emildikten sonra hidrolize olarak karaciğer ve kanda aktif metaboliti olan salisilik asite dönüşür ve burada plazma proteinlerine bağlanarak bütün vücuda dağılır (103). Aspirin siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzim inhibisyonu yapan ilaçlara benzerlik gösterdiğinden Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) grubuna dahil edilmiştir. 1950'li yıllardan sonra bulunan parasetamol ve ibuprofen grubu ilaçların ortaya çıkmasıyla aspirine olan ilgi azalmıştır. Ancak aspirinin vücuttaki etkileri anlaşıldıkça başka hastalıklara karşı da etkili olabileceği düşünülerek halen güncelliğini korumakta ve birçok araştırma yapılmaktadır.

Aspirinin temel etki mekanizması, COX-1 ve COX-2 enzim aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmesidir. Bu inhibisyon COX-1 enziminin 529. pozisyonundaki serin aminoasidinin (ser529), COX-2'de ise 516. pozisyonundaki serin aminoasidinin (ser516) asetillenmesi ile gerçekleşmektedir. Asetillenen enzimin aktivitesi geri dönüşümsüz olarak baskılanmaktadır (104). Aspirin, siklooksijenaz grubu enzimler olan COX-1'e, COX-2'ye oranla 150-200 kat daha fazla affinite göstermektedir. Bu durum antitrombotik etki (COX-1 enzimiyle) ve anti-inflamatuvar etki (COX-2 enzimiyle) elde etmek için aspirinin neden farklı

dozlarda kullanıldığını göstermektedir (105). COX-1 trombositlerde, COX-2 ise inflamatuvar yanıt gösterebilen hücrelerde daha fazla oranda bulunmaktadır. COX izoenzimlerinin inhibisyonu aspirin dozu ile ilişkilidir. Düşük doz aspirin COX-1'i inhibe edebilirken, COX-2'nin inhibisyonu için ise, yüksek dozlar gerekmektedir (106).

Aspirin, prostaglandin ve tromboksan üretimini engellemenin yanı sıra vitamin-K antagonizması, trombin üretimini azaltması ve pıhtılaşma faktörlerini asetillemesiyle kardiyovasküler hastalıkları önlemektedir. Ayrıca, LDL kolesterolün okside olmasını önleyerek antioksidan etki gösterir, aterosklerotik plakta inflamasyonu azaltır ve endotel bütünlüğüne katkıda bulunur (105).

Oksidatif stres; oksidan/antioksidan balansın oksidanlar lehine artması olarak tanımlanmaktadır(107,142). Oksidan bileşiklerin aşırı artışı veya organizmadan uzaklaştırılmaması hücrelerinin protein, lipid ve DNA'larında hasara neden olabilmekte ve özellikle DNA'lardaki tamir edilemeyen kalıcı hasarlar kansere kadar giden çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (107). Çeşitli klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda serbest radikallerin DNA'ya bağlandığı ve mutasyona sebep olarak kanseri indüklediği gösterilmiştir (108–111). Kandemir ve arkadaşlarının yaptığı klinik bir çalışmada, opsesif-kompulsif bozukluğu olan kişilerde oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stresin hastalığın patogenezinde önemli bir role sahip olabileceğini bulmuşlardır (112). Demirkol ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise karpal tünel sendromunda toplam oksidan seviye ve oksidatif stres indeksinin arttığı, toplam antioksidan seviyenin ise azaldığı bulunmuştur. Oksidan/Antioksidan dengede meydana gelen bu değişikliklerin median sinir ve tenosinovyumda sinyal paternlerini bozmasıyla fibrozisi stimüle edebileceği ve dolayısıyla hastalığın gelişimine ve ortaya çıkmasına katkıda bulunacağı bildirilmektedir (113).

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için insan serum, eritrosit ve dokularında genel olarak antioksidanlar diye adlandırılan bir defans mekanizması mevcuttur. Antioksidanlar hem endojen serbest radikalleri inaktive etmek için hem de ksenobiyotik metabolizmasından sonra ortaya çıkan elektrofilik ara ürünleri yeniden inaktive etmek için direk veya indirekt olarak etki edebilir ve böylece DNA'daki makromoleküler

hasarı önleyebilirler. Antioksidanlarla, DNA hasarının ve lipid peroksidasyonunun azaltılması, bu makromoleküllerle serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin etkileşiminin azaltılması yoluyla olabilir. Antioksidanlar, bu doku hasar reaksiyonlarını önlemek için direkt olarak etki edebildikleri gibi indirgenmiş glutatyon ve enzim formasyonunun arttırılması yoluyla indirekt olarak da etki edebilirler. Antioksidanların DNA sentez ve tamiri üzerindeki etkisi halen tam olarak bilinmemektedir. Antioksidan sistem bir bütünlük içinde çalışmakta ve hücreyi toksik oksijen radikallerine karşı korumaktadır. Sistem içinde yer alan moleküllerden birinin hasarı dengeyi bozabilmekte hücre hasara ve karsinomlara yol açabilmektedir (114). Oksidatif stres ve DNA hasarı arasındaki pozitif ilişkiyi açıklayan bir çalışmada, kardiyak sendrom X hastalarında lenfosit DNA hasarının arttığı bulunmuştur. Bu artışın kronik inflamasyon ve yükselmiş oksidatif stresle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu hipotez DNA hasarı ile toplam antioksidan seviye ve hsCRP arasındaki bağımsız korelasyonun varlığı ile desteklenmiştir (115).

Bu çalışmada, farklı ASA konsantrasyonlarının insan lenfosit hücre kültürü ortamında genotoksisite ve oksidatif durum üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Aspirinin siklooksijenaz grubu enzimlere olan farklı ilgisinden dolayı insan lenfosit hücreleri üzerinde farklı dozlarda ve farklı inkübasyon sürelerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca ASA'nın sitotoksik etkisini araştırmak için MTT analizi de yapılmıştır. Demircan G.'nin yaptığı "Aspirinin vasküler endotel hücre kültüründe oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkilerinin araştırılması" konulu doktora çalışmasında endotel hücrelere 1 mM üzerinde aspirin verilmesi hücrelerin sayısında azalmaya sebep olacak düzeyde toksik etki yaptığı bulunmuştur (104).

Çeşitli insan hücre tipleri üzerinde yapılan çalışmalarda ASA'nın hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği rapor edilmektedir (116). Son yayımlanan *in vitro* araştırmalarda ASA'nın insan kolorektal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği (117,118), endometriyal kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu (119), insan oral kanser hücre dizilerinde ve kronik lenfositik lösemi hücrelerinde kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptozisi başlattığı rapor edilmektedir. Tanja Duzic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki asetilsalisilik asitin normal insan lenfosit hücre kültürü üzerinde farklı inkübasyon sürelerindeki hücre canlılığı ve proliferasyonu incelenmiştir. 1 mmol/L, 3 mmol/L ve 5

mmol/L ASA konsantrasyonlarının lenfosit hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonundan sonra hücre canlılığı WST-1 testi ile incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 3 ve 5 mmol/L ASA konsantrasyonlardaki canlılık, sırası ile %9,9, %2,5 ve %16,9 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızın aksine konsantrasyon bağımlı olarak ortaya çıkan hücre canlılığındaki bu farklılıklar, kullanılan ASA'nın ortam pH'sını değiştirmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (116).

Bellosillo ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise Aspirin ve salisilatın, kronik lenfositik lösemi hastalarının B hücrelerinde ve normal periferel mononükleer hücrelerdeki kaspaz aktivasyonu ve apoptozisi indükleyip indüklediği araştırılmıştır. Öncelikle sitotoksik konsantrasyonların belirlenmesi için MTT analizi kullanılmıştır. Kronik lenfositik lösemi hastalarının B hücrelerinde sitotoksik ASA konsantrasyonu (IC₅₀) 7,5 mmol/L iken aynı konsantrasyonda normal periferel mononükleer hücrelerdeki canlılığı %75 civarındadır. Normal periferel mononükleer hücrelerde 7,5 mmol/L ASA konsantrasyonlarına kadar sitotoksik etkinin görülmediği, sitotoksik dozun (IC₅₀) 15.8±6.2 mmol/L ASA konsantrasyonlarında olduğu bildirilmektedir. Bu bulgu normal periferel mononükleer hücrelerin, kronik lenfositik lösemi hastalarının B hücrelerine göre aspirin dozuna cevap olarak daha dirençli olduğunu göstermektedir (120).

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubuna göre %50 absorbans azalması ile belirlenen sitotoksik doz (IC₅₀) düzeyi 4.3mmol/L ASA olarak bulunmuştur. Vasküler endotel hücre kültüründe 1 mmol/L ASA konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlar sitotoksik doz olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular lenfosit hücrelerinin, vasküler endotel hücrelerine göre yüksek ASA konsantrasyonlarına sitotoksik etki bakımından daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak mononükleer lenfositler üzerinde ASA'nın sitotoksik etkilerini inceleyen diğer çalışmalarda çıkan farklılıklar ise kullanılan asetilsalisilik asitin ticari formu, hücre kültüründe kullanılan medyumlar, farklı organik çözücülerin kullanımı ve deneyler esnasında ortam pH'sının stabilitesinin korunamaması gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Bunun yanında, araştırma bulgularımıza göre 1mmol/L ASA konsantrasyonu, diğer ASA konsantrasyonlarına göre kontrol grubuyla hemen hemen aynı yüzde canlılığa sahiptir.

Dünya üzerinde otuz milyon insan günlük olarak non-steroid antiinflamatuvar ilaçları kullanmaktadır (121). Tüketim ve biyolojik aktivasyon olarak bu grubun en yaygın üyelerini naproksen, parasetamol, diklofenak, ibuprofen ve asetilsalisilik asit oluşturmaktadır. Yüksek etkinliği ve düşük maliyetiyle ASA, diğer non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar arasında 90 yılı aşkın süredir en yaygın kullanılanlardandır (122). ASA'nın bazı türlerde oksidatif stresi ve DNA hasarını indüklediği bildirilmektedir. Gomez-Olivan ve arkadaşlarının su pirelerinde ASA'nın DNA hasarı ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 88,3 mg/L (0,488 mmol/L) ASA median letal konsantrasyonunun, DNA hasarı ve oksidatif stres bakımından 24 saatlik inkübasyonda kontrol grubu ile herhangi bir istatistiksel farklılık olmamasına karşın ($p>0,05$), 48 saatlik inkübasyonda 88,3 mg/L ASA konsantrasyonunun DNA Hasarı ve Oksidatif stres açısından kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunduğu rapor edilmiştir (123).

Aspirinin kimyasal koruyucu ajan olarak da kullanılabilmesi önerilmektedir. Diğer taraftan aspirin ile ilgili en son yapılan kohort çalışmalarında aspirinin pankreatik kanser riskini artırabileceği gösterilmektedir. Bu konuyla ilgili olarak Oikawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada aspirinin dokularda, özellikle karaciğerde biyotransformasyonu ile oluşan metaboliti 2,3-dihidroksibenzoik (2,3-DHBA) asitin insan pankreatik kanser hücreleri (PANC-1) üzerindeki karsinojenik etkileri, oksidatif stres ve DNA hasar düzeylerindeki değişimleri araştırılmıştır. Karsinojenik etkilerin olup olmadığı kanser insidansı ile korele olan 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) formasyonunun oluşumu ile belirlenirken, oksidatif stres; 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)'nin ortalama floresans yoğunluğunun flowsitometrik ölçümü ile ve DNA Hasarı ise comet assay yöntemiyle tespit edilmiştir. PANC-1 hücrelerinin 2,3-DHBA ile inkübasyonu sonucu, konsantrasyon bağımlı olarak 8-oxodG ve reaktif oksijen türlerinin arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Comet assay yöntemi ile ölçülen DNA hasar düzeylerinin de konsantrasyon bağımlı olarak yükseldiği ve istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0,05$) olduğu rapor edilmektedir (124). 2,3-DHB, birçok dokuda, ama çoğunlukla hepatik endoplazmik retikulum ve mitokondride salisilik asitin biyotransformasyonu ile oluşan küçük bir fraksiyonudur (125). 2,3-DHB asitin yukarıda bahsedilen karsinojenik etkileri 2 mmol/L konsantrasyonda olduğunda gözlenmektedir. Ancak 2 mmol/L 2,3-DHB asitin hangi konsantrasyondaki aspirine karşılık geldiği bilinmemektedir.

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, aspirinin uzun dönemli kullanımında kolorektal adenom ve karsinomların insidansını azalttığını göstermektedir (126). Düzenli düşük doz aspirin kullanımı fetal kolon kanser riskini düşürmekte (127) ve hatta çeşitli hayvan modellerinde kimyasal olarak indüklenen karsinogenezisi inhibe ettiği işaret edilmektedir (128-131).

Niikawa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada aspirinin ve aspirin metabolitlerinin, *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde mitomiyozin C (MMC) ile indüklenmiş mutant kanat noktaları süprese ettiği bildirilmektedir. Aspirin kromozom rekombinasyonunu inhibe etmektedir, bu inhibisyon aspirinin bio-antimutajenik etkisinden dolayı olabilir. MMC; antibakteriyel spektrumlu, potent bir antikanser ajan olarak kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmasının yanında mutajenik ve/veya karsinojenik özelliklere sahip olmasından dolayı sekonder kanser oluşturma riskine sahiptir. Bu durum kanser tedavilerindeki en ciddi problemlerden biridir. MMC'nin genotoksik ve rekombinagenik etkilerini nötralize etmek için deney modeline MMC ile birlikte antigenotoksik etkiye sahip aspirin de uygulanmış ve değerlendirilmiştir (132).

Niikawa ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise daha önce rapor ettikleri sonuçlardan yola çıkarak *Drosophila melanogaster* larvalarında MMC ile indüklenmiş DNA hasarı modelinde aspirinin antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada aspirinin, MMC terapisi ile birlikte, MMC terapisi uygulandıktan sonra ve MMC terapisi uygulanmadan önceki antigenotoksik etkileri incelenmiştir. Araştırma bulgularına göre aspirinin antigenotoksik etkisinin mekanizması; 1) aspirin sitokrom P-450 redüktazı inhibe ettiği, 2) MMC tarafından oluşturulan serbest radikalleri temizlediği, 3) MMC ile indüklenen DNA hasarını tamir etmediği ve 4) DNA hasarını önlemede herhangi bir etkiye sahip olmadığı şeklinde speküle edilmektedir (133).

Asetilsalisilik asit, miyokard infarktüsü ve oklüzyon inmesi gibi aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların komplikasyonlarından korunmak için de kullanılmaktadır. ASA tedavisi, gerçekleşebilecek ilk miyokard infarktüsü riskini %32 oranında azalttığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Ayrıca ASA, akut koroner sendromlu hastaların tedavisinde de kullanılmaktadır (134). Oksidatif stres özellikle aterosklerozis gibi kardiyovasküler

hastalıkların gelişiminde ve patogeneğinde önemli bir role sahiptir (135). Lipoproteinler içinde özellikle LDL'nin oksidatif modifikasyonla oluşan formu okside LDL (ox-LDL); aterosklerotik lezyon gelişimini artırmakta, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indüklemekte, vazodilatasyonu bozmakta ve endotelial hücrelerde toksik etki oluşturmaktadır (136). ASA'nın LOX-1 (lektin yapılı reseptör-1) aracılı ox-LDL ekspresyonunu inhibe ettiği ve hücre içi ox-LDL sinyallerini etkileyerek ve sonrasında kolajenaz aktivitesini (MMP-1) engellediği rapor edilmektedir (137). Kurban ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 150 mg/gün ve 100 mg/gün ASA kullanan sağlıklı gönüllülerin 1. ve 2. ay sonundaki serum örneklerinde Paraoksanaz/Arilesteraz aktivitesi, TAS, TOS, Ox-LDL ve koenzim Q10 seviyeleri araştırılmıştır. Araştırma bulgularına göre 100 mg/gün ve 150 mg/gün ASA kullanan sağlıklı gönüllülerin 1. ay sonundaki serum örneklerinde ölçülen parametreler ile ASA kullanımına başlamadan önceki alınan serum örnekleri arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılığın olmadığı bulunmuştur. ASA kullanımına başlanmasından 2 ay sonraki 100 mg/gün ASA kullanan grupta oksidan ve antioksidan parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemişken, 150 mg/gün ASA kullanan grubun ox-LDL ve TOS düzeyleri, ASA kullanımına başlamadan önceki serum örneklerine göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (138). Bu bulgu, ASA'nın uzun dönemde yüksek dozda kullanıldığında sağlıklı bireylerde bile oksidatif strese sebep olduğunu göstermektedir.

Aspirininde dahil olduğu non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların kanser riskini azalttığı görüşü yaygın şekilde kabul edilmektedir. Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların anti-kanser ve antiinflamatuvar etkileri prostoglandin sentezi ve siklooksijenaz-2 enzim aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkilidir. Hem *in vivo* hemde *in vitro* şartlarda oluşturulan farklı kanser modellerinde bu ilaçların anti-kanser etkilerine katkıda bulunan başka mekanizmaların olduğu tahmin edilmektedir. Fakat aspirinin anti-kanser ve antiinflamatuvar etkilerinin moleküler mekanizmaları hala açık değildir. Bu konuyla ilgili olarak Raza ve arkadaşları, insan hepatoma HepG2 hücrelerinde asetilsalisilik asitin, oksidatif stres, hücre siklusu, apoptozis ve mitokondriyal fonksiyon üzerine etkilerini araştırmışlardır. Aspirinin nisbeten yüksek konsantrasyonları (5 ve 10 µmol/ml) 24 ve 48 saat boyunca HepG2 hücreleri ile inkübe edilmiş ve yukarıdaki parametreler değerlendirilmiştir. İnkübasyon için seçilen süreler normal terapötik aralığın dışında tutulmuştur. HepG2 hücrelerinde MTT analizi ile sitotoksik etki oluşturan ASA konsantrasyonları belirlenmiş olup; 24 ve 48 saat sonunda her iki

inkübasyon süresi sonunda da artan ASA konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda %50 ve daha yüksek absorbans azalması (maksimum inhibisyon) görülen ASA konsantrasyonu 20 µmol/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada 5 ve 10 µmol/ml ASA konsantrasyonları kullanılmıştır (139).

Raza ve arkadaşlarının araştırma sonuçlarına göre her iki inkübasyon süreleri sonunda özellikle 10 µmol/ml ASA konsantrasyonunun G0/G1 fazında hücre siklusunu durdurduğu, 24 saatlik inkübasyonda 10 µmol/ml ASA ve 48 saatlik inkübasyon sonunda ise hem 5 µmol/ml hemde 10 µmol/ml ASA'nın apoptozise sebep olduğu, reaktif oksijen türleri süpürücüsü olarak kabul edilen total glutatyonun konsantrasyon bağımlı olarak her iki inkübasyon süreleri sonunda azaldığı ve buna bağlı olarak her iki inkübasyon süresinde de 10 µmol/ml ASA konsantrasyonunun reaktif oksijen türlerini artırdığı, her iki ASA konsantrasyonunun lipid peroksidasyonunu yükselttiği ve son olarak mitokondriyal membran potansiyelinin disfonksiyonel olmasına sebep olduğu rapor edilmektedir. Mitokondrideki fonksiyon kaybına paralel olarak her iki ASA konsantrasyonunun apoptozis indikatörü kaspaz 3 aktivitesinde artışa ve ATP sentezinde azalışa neden oluştu bildirilmektedir (139). Asetilsalisilik asit'in yüksek konsantrasyonlarının hücre içi reaktif oksijen türlerini artırmasına paralel olarak mitokondri permeabilitesini bozduğu, elektron transport zincirinde görevli enzimlerin inhibisyonu ve membran bütünlüğünün kaybolmasıyla sitoplazmaya geçen sitokrom c'nin apoptoz oluşum yollarını indüklediği öngörülmektedir.

Asetilsalisilik asitin oksidan özelliklerinin yanında antioksidan özelliklerinin olduğunu ifade eden Grosser ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hidrojen peroksit maruziyetinde aspirinin konsantrasyona bağlı olarak endotel hücrelerini sitotoksiteden koruduğu gösterilmiştir. Bu da aspirinin hidrojen peroksitin zararlı etkisinden endotel hücrelerini koruma kapasitesi ve serbest radikal kovucu özellikleri olduğunu gösterir (140).

Asetilsalisilik asitin oksidan/antioksidan ve genotoksik etkilerinin (DNA hasarı) araştırıldığı literatür kaynaklarından elde edilen bulgular göz önüne alındığında, bizim çalışmamızda en yüksek ASA konsantrasyonu olan 5 mmol/L ASA ilk iki saatlik inkübasyon süresi sonunda diğer ASA gruplarına göre en düşük TOS seviyesine sahiptir. Bu bulgu

endotel hücreleri üzerinde yapılan aspirinin serbest radikal kovucu özelliği olduğu sonucunu desteklemektedir. Ayrıca yukarıda özetlenen bazı literatür kaynaklarında ASA'nın reaktif oksijen türlerini ve ox-LDL gibi oksidatif strese yol açabilecek oksidan bileşikleri yükselttiği bildirilmektedir. Bu bulgular, ASA'nın uzun süreli kullanıldığında veya hücre hatlarıyla uzun dönemli inkübe edildiğinde elde edilen sonuçlardır. Bizim araştırma bulgularımıza göre de, çalışmamızda kullandığımız en yüksek ASA konsantrasyonu olan 5 mmol/L ASA; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda en yüksek TOS seviyesine sahip ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışmamızda kullandığımız tüm ASA konsantrasyonları içinde uzun dönemli inkübasyonda en düşük TOS düzeyi 1 mmol/L ASA konsantrasyonu idi. 1 mmol/L ASA konsantrasyonu, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda negatif kontrol grubu da dahil olmak üzere bütün ASA konsantrasyonlarından daha düşük TOS düzeyine sahip ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Son zamanlarda aspirinin antioksidan özelliklerini kanıtlayan veriler hızla artmaktadır. Çalışmamızda ASA'nın farklı konsantrasyonlarının lenfosit hücreleri üzerindeki uzun süreli ve kısa süreli inkübasyonu sonucundaki toplam antioksidan seviyeleri araştırılmıştır. Bizim verilerimize göre ASA'nın uzun ve kısa dönemli inkübasyonun da en yüksek antioksidan aktivitenin 1 mmol/L ASA konsantrasyonu olduğu bulunmuştur. 1 mmol/L ASA konsantrasyonu; 1, 2 ve 3 saatlik inkübasyon süreleri sonunda herhangi bir işlem uygulanmayan negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TAS düzeyleri açısından istatistiksel bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$), 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kontrol grubuna göre düşük fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). TAS düzeyinin en düşük olduğu ASA konsantrasyonları ise 4,5 mmol/L ASA ve 5 mmol/L ASA'dır. Bu bulgu MTT analizi ile tespit edilen 4,3 mmol/L ASA sitotoksik dozunun doğruluğunu teyid etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, ASA'nın yüksek konsantrasyonlarının antioksidan aktiviteyi düşürdüğü hipotezi bizim araştırma sonuçlarımızla da desteklenmektedir (138).

ASA konsantrasyonlarının farklı inkübasyon sürelerindeki DNA hasar düzeyleri incelendiğinde ilk üç saatlik inkübasyon süreleri sonunda tüm gruplarda belirgin bir farklılık yokken uzun süreli inkübasyonlarda konsantrasyon bağımlı olarak DNA hasarı artmıştır. Özellikle 3, 4, 4.5 ve 5 mmol/L ASA konsantrasyonlarında DNA hasarı zamana bağlı olarak dramatik bir şekilde yükselmiştir. En düşük ASA konsantrasyonu olan 1 mmol/L ASA grubunda uzun dönemli inkübasyonlarda DNA hasar düzeyinde belirgin bir artış olmamıştır. DNA hasarı ile oksidatif stres indeksi arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş olup ($p<0.001$, $r=0.851$), DNA hasarındaki yüksekliğin ASA etkisiyle oluşan serbest radikallerin sebep olduğu öngörülmektedir. Bu doğrultuda DNA hasarı ve toplam antioksidan seviye arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$, $r=-0.715$). Bazı literatür kaynaklarında aspirinin, kimyasal etkenlerle oluşturulan DNA hasarını tamir etmediği veya DNA hasarı oluşumuna karşı herhangi bir koruyucu etkiye sahip olmadığı rapor edilmişse de bizim bulgularımıza göre 1 mmol/L ASA'nın lökosit hücre kültüründe hem kısa dönemli inkübasyonlarda hem de uzun dönemli inkübasyonlarda DNA hasarı oluşumunu önlediği bulunmuştur.

Aspirinin ticari formlarında; anti-inflamatuvar, antipiretik ve analjezik etki göstermesi beklenen akut kullanımlarında yüksek doz, miyokard infarktüsü ve inme gibi kardiyovasküler durumların gerçekleşmemesi için anti-trombotik etki göstermesi beklenen uzun süreli kullanımlarda ise düşük dozlar kullanılmaktadır. Bizim sonuçlarımıza göre de yüksek konsantrasyonlardaki ASA düzeylerinin kısa süreli inkübasyonlarda, düşük konsantrasyondaki ASA düzeylerinin de uzun süreli inkübasyonlarda oksidan/antioksidan ve genotoksik etki bakımından uygun olduğu kanaatindeyiz. Bu hipotezimiz aspirinin ticari formlarında kullanılan dozlarla da paralellik gösterdiğinden bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Sonuçlarımız ışığında, asetilsalisilik asitin insan lenfosit hücreleri ile uzun dönemli inkübasyonunda 1 mmol/L, kısa süreli inkübasyonlarda ise 5 mmol/L konsantrasyonun oksidan/antioksidan ve DNA hasarı bakımından optimum konsantrasyonlar olduğunu ve bu konsantrasyonları aşmadığımız ölçüde rahatlıkla kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte, bu bulgularımızın daha detaylı moleküler ve klinik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla teyit edilmesi asetilsalisilik asitin oksidan/antioksidan ve genotoksik etkileri konusunda bilinmeyen mekanizmaların aydınlatılması bakımından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*, 2000;101(10):1206-18.
2. Nietsch P. Aspirinin Terapötik Uygulamaları. Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd.Şti. İstanbul. 1991.
3. Kauffman JM. Should you Take Aspirin to Prevent Heart Attack?. *J. Scientific Exploration*, 2000;14(4):623-641.
4. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*, 2003;110:255-258.
5. http://pharmahost.org/support/index.php?title=Acetylsalicylic_Acid (accessed 14:25, Oct 13, 2014)
6. Demir M. Antitrombositler Tedavi. Türk Hematoloji Derneği-Temel Hemostaz Tromboz Kursu, 2007.
7. Kayaalp O. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji-2. Cilt. Yedinci baskı, Feryal Matbaacılık, 1995:1957-2013.
8. Topçuoğlu MA, Selekler K. Keşfinin 100. Yılında Aspirin. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı. Ankara.1996.
9. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low- dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest*. 1982;69:1366-1372.
10. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J*. 1988;256:251-5.
11. Satılmış M, Bilgili A. Review Article: Nonsteroid Antiinflatuar İlaçların Yeni Kullanım Seçenekleri. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University*. 2013;10(1):63-71.
12. Tunaoğlu SF. Aspirin ve Çocukluk Çağı Romatizmal Hastalıklarında Kullanımı. *Klinik Pediatri*, 2002;1(1):26-34.

13. Odabaşı Z, Altun S. Organik Kimya Laboratuvarı. Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstanbul, 2014.
14. Aydın BK. Aspirin ve Vitamin E (t-tocopherol) verilmiş ratlarda karaciğerde yapılan iskemi/reperfüzyon sonrası eritrosit radikal süpürücü enzim (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz) aktivitelerindeki değişiklikler. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun, 2003.
15. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2157.html> (accessed 14:06, Jan 11, 2015)
16. Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost.* 2006;96(4):401-6.
17. Kuster LJ, Frolich JC. Trombosit aggregation and thromboxane release induced by arachidonic acid, collagen, ADP and trombosit-activating factor following low dose acetylsalicylic acid in man. *Prostaglandins*, 1986;32:415-423.
18. Allen KN. Aspirin-now we can see it. *Nature Med.* 1995;1:882-883.
19. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nédélec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*, 1997 Apr;53(4):563-82.
20. Umutoğlu T. Aspirin Kullanımının Platelet Agregasyonu İnhibisyon Süresi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Anestezi ve Reaminasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007.
21. Gabriel SA, Beteli CB, Taniguchi RS, Tristao CK, Gabriel EA, Job JR. Aspirin resistance and atherothrombosis. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2007;22:96-103.
22. Bing JR, Yamamoto T, Yamamoto M, Kakar R, Cohen A. Review: New look at myocardial infarction: toward a better aspirin. *Cardiovascular Research.* 1999;43:25-31.
23. Solomon DH. NSAIDs: Mechanism of action. *UpToDate* 17.2: 2009.
24. Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defence. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2008;24:665-673.
25. Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defence. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2009;25:537-543.

26. Lichtenberger LM. NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. *J. Pharmacy Pharmacology*, 2006;58:1-8.
27. Lichtenberger LM. Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of NSAID-induced gastrointestinal injury?. *Biochemical Pharmacology*, 2001;61:631-637.
28. Musumba C, Pritchard DM, Pirmohamed M. Review article: Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30:517-31.
29. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, FCCP, Roth G. Platelet-Active Drugs: The Relationships Among Dose, Effectiveness, and Side Effects The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004;126:234-264.
30. Erdogan HM, Gunes V, Gokce HI, Uzun M, Cıtlı M, Yuksek N. Effects of prolonged intravenous of flunixin meglumine in healthy dogs. *Acta Vet Brno.* 2003;72:71-8.
31. Hankey G, Eikelboom J. Aspirin resistance. *Lancet*, 2006;9510:606-17.
32. Gökalp D. Diyabetik Hastalarda Aspirin Direnci Sıklığı ve Metabolik Parametrelerle İlişkisi. Dicle Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, 2009.
33. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2007;32(3);104-11.
34. Bektaş İ. Hücre Kültürü Ortamında Çörek Otu (*Nigella Sativa*) ve Sarımsak (*Allium Sativum*) Ekstraktlarının DNA Hasarı Üzerine Etkisinin Araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2010.
35. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2009;7(2):61-70.
36. Friedberg EC. DNA damage and repair. Review: *Nature.* 2003;23:436-40.
37. Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953;171(4356):737-8.
38. <http://www.biyolojisozluk.com/ders/lys-nukleik-asit-konu-anlatimi/#axzz2cRcLYtBC> (accessed 12:10, Nov 15, 2014)
39. <http://breakingmuscle.com/health-medicine/how-to-strengthen-your-dna-and-create-super-babies> (accessed 12:25, Nov 15, 2014)

40. <http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH/Aging/Aging3.html> (accessed 14:18, Nov 16, 2014)
41. Yetişmiş MR. DNA Onarım Mekanizmaları. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü. Bitirme Tezi.
42. Jackson SP, Bartek J. The DNA damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009;461:1071–8.
43. <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf> (accessed 12:10, Jan 15, 2015)
44. Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H, Retel J. *Mutat. Res.* 1994;309:45–52.
45. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev.* 1989;89(24):503-520.
46. Turkdogan MK, Özbek H, Yener Z. The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 2000;17(8):942-946.
47. Kuppasamy UR, Dharmani M, Kanthimathi MS, Indran M. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. *Biol Trace Elem Res.* 2005;106: 29-40.
48. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-28.
49. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyal. ve Transplant. Dergisi/Office J. Turkish Nephrol. Assoc.* 1997;3(4):92-95.
50. Yükselten Y. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) ve Isırgan Tohumu (*Fructus urtica piluliferae*) Ekstraktlarının Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2012.
51. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1995;35: 21-29.
52. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982;4:412-426.

53. Bozkus F, San I, Ulas T, Yesilova Y, Guler Y, Aksoy N. Evaluation of total oxidative stress parameters in patients with nasal polyps. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2013;33(4):248-53.
54. Aslan R, Sekeroğlu MR, Bayıroğlu F, Gültekin F. Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals: relation to age, sex, exercise, air pollution and life habits. *J. Environ. Sci. Health*, 1997;32:2101-2109.
55. Bagasa HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem et Biophysica Acta.* 1990;1047:255-263.
56. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch. Surg.* 1991;126:104-108.
57. Kargın F, Fidancı U R. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar. *Türk Vet. Hek. Derg.* 1997;9(2):26-28.
58. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
59. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bull.* 1993;49(3):481-493.
60. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc. Nutr.* 1987;46(1):13-26.
61. Fortone JC, Word PA. Role of Oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte dependent inflammatory reaction. *Am. J. Pathol.* 1982;107(3):397-413.
62. Kalyanamaran B, Perez E, Mason RP. Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anti-cancer drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980;630:119-120.
63. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222:1-15.
64. Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH. Effect of tobacco smoke components on cellular and biochemical process in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;136(4):1058-64.
65. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989;140:531-554.
66. Rahman I, Macnee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 1996;51:348-350.
67. Norton ID, Apte MY, Lux O, Haber PS. Chronic ethanol administration causes oxidative stress in the rat pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 1998;131:442-446.

68. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Review: Pesticides and oxidative stress. *Med. Sci. Monit.* 2004;10:141-147.
69. Stahl M, Bouw R, Jackson A, Pay V. Human Microdialysis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(2):165-78.
70. Taşkın A. Sıtma Hastalarında lökositlerin Oksidatif Stresinin Araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2010.
71. Meister A. Glutathione Ascorbate and cell cycle regulation. *FEBS letters.* 1994:1-4.
72. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988;63(3):381-8.
73. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995;41(12):1819-28.
74. Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74:139-62.
75. Mead JF. Free radical mechanism of lipid damage and consequence for cellular membranes. In Poyor WA, ed *Free Radicals and Biology.* New York, 1989;176-181
76. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*, 24th Ed. 1996.
77. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991;53:201.
78. Tekkes Y. Streptozotisin ile diyabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamini dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2006.
79. Nair V, Cooper Cs, Vietti De, Turner Ga. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids.* 1996;21(1):6-10.
80. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:933-56.
81. Ripine JE, Bast A, Lankharst I, and The Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Respir Crit Care Med.* 1997;156(26):341-347.
82. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1984;1(8391):1396-7.

83. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(17):7915-22.
84. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet*, 1994;344(8924):721-4.
85. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpasa J Med*. 2004;35:159-169.
86. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*. 1992;75:331-342.
87. Bonnefont Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of The Diabetic Status on The Oxidant/Antioxidant Balance. *Diabetes and Metabolism*, 2000;26:163-176.
88. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose Toxicity in Cell: Type II Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and The Glutathione Connection. *Diabetes*, 2003;52:581-587.
89. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.
90. Byung PY. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews*, 1994;74(1):139-172.
91. Maccord JM, Fridowich I. Superoxide dismutase, an enzymic function of Erythrocyte. *J. Biol. Chem*. 1969;244:6049-6055.
92. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
93. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res*. 1988;175:184-191.
94. Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H, Retel J. The formation of one G deletions as a consequence of single-oxygen-induced DNA damage. *Mutat. Res*. 1994;309(1):45-52.
95. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev*. 1989;89(3):503-520.
96. Halliwell B, Dizdaroglu M. Free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *J. Free Radical Res*. 1992;16:75-87.

97. Horwood E, Epe B. DNA and Free Radicals. Chichester, 1993;41-65.
98. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *J. Mutat. Res.* 1992;275(35):331-342.
99. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry.* 2005;47(5):119-29.
100. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry,* 2004;37:277-285.
101. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr.* 2005;164:775-778.
102. Aycicek A, Varma M, Ahmet K, Abdurrahim K, Erel O. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. *Eur J Pediatr.* 2011;170(5):645-51.
103. Drew JE, Arthur JR, Farquharson AJ, Russell WR, Morrice PC, Duthie GG. Salicylic acid modulates oxidative stress and glutathione peroxidase activity in the rat colon. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(6):888-93.
104. Demircan G. Aspirinin vasküler endotel hücre kültüründe oksidatif ve nitrozoatif stres üzerine etkilerinin araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Samsun, 2011.
105. Aktürk E, Topal E, Aksoy Y. Aspirin Direnci. *Türk Kardiyoloji Derneği,* 2005;33:480-487.
106. Demir M. Antitrombositler Tedavi. Temel Hemostaz Tromboz Kursu. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, 2007.
107. Eze MO, Hunting DJ, Ogan AU. Reactive oxygen production against malaria--a potential cancer risk factor. *Med Hypotheses.* 1990;32(2):121-3.
108. Birnboim HC. DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor promoter phorbol myristate acetate. *J. Mutat. Res.* 1982;215:1247-1249.
109. Olinski R, Jaruga P, Zastawny TH. Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *J. Acta Biochem Polonica.* 1998;45(4):551-57.
110. Rikans LE, Hornbrook LR. Lipid peroxidation, antioxidant and aging. *J. Biochim Biophys Acta.* 1997;1362(1):116-27.

111. Soruga P, Zastawny TH, Skakowski J. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.* 1999;34:59-64.
112. Kandemir H, Abuhandan M, Aksoy N, Savik E, Kaya C. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with obsessive compulsive disorder. *J. Psychiatr Res.* 2013;47(11):1831-4.
113. Demirkol A, Uludag M, Soran N, Aksoy N, Gun K, Incebiyik S, Gurgen I, Vural M, Altun Y, Kesiktas FN. Total Oxidative stress and antioxidant status in patients with carpal tunnel syndrome. *Redox Rep.* 2012;17(6):234-8.
114. Çelik H. Malarya (sıtma) hastalarında oksidatif stres ve mononükleer lenfosit DNA hasarının araştırılması. HR.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Şanlıurfa, 2005.
115. Gur M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigit A, Celik H, Aksoy N. Increased lymphocyte deoxyribonucleic acid damage in patients with cardiac Syndrome X. *Mutation Research,* 2007;617:8-15.
116. Dujic T, Causevic A, Malenica M. The effects of different concentrations of acetylsalicylic acid on proliferation and viability of lymphocytes in cell culture. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences,* 2008;8(3):210-213.
117. Yu HG, Huang JA, Yang YN, Huang H, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 2002 Nov;32(11):838-46.
118. Yu HG, Huang JA, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 mRNA expression: a novel mechanism for acetylsalicylic acid-mediated growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Regul Pept.* 2003 Jul;114(2-3):101-7.
119. Arango HA, Icely S, Roberts WS, Cavanagh D, Becker JL. Aspirin effects on endometrial cancer cell growth. *Obstet Gynecol.* 2001 Mar;97(3):423-7.
120. Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Pons G, Gil J. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leucemia cells. *Blood,* 1998;92(4):1406-1414.

121. Morera Salas M, Aparicio Llanos A, Xirinachs Salazar Y, Barber Perez P. Consumption of nonsteroidal anti-inflammatory agents in primary care in Costa Rica: changing patterns and geographical variability. *Gac Sanit.* 2007;21(6):458-64.
122. Katzung B. 2007. *Farmacologia Basica y Clinica*, Novena ed. Manual Moderno Mexico, DF.
123. Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, García-Medina S, SanJuan-Reyes N. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2014;164:21-6.
124. Oikawa S, Kobayashi, Tada-Oikawa S, Isono Y, Kawanishi S. Damage to cellular and isolated DNA induced by a metabolite of aspirin. *Mutat Res.* 2009;661(1-2):93-100.
125. Turgut NH, Söylemezoğlu T. Aspirinin hepatoksik etkisi ve Reye Sendromu. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 2011;33:125-132.
126. Gwyn K, Sinicope FA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:13.
127. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath Jr CW. Aspirin use and reduced risk of fetal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991;325:1593.
128. Mori H, Sugie S, Rahman W, Suzuni N. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 1999;143:195.
129. Barnes CJ, Lee M. Determination of an optimal dosing regimen for aspirin chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *Br J Cancer.* 1999;79:1646.
130. Baron JA, Sandler RS. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med.* 2000;51:511.
131. Duperron C, Castonguay A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis*, 1997;18:1001.
132. Sato T, Nagaoka K, Nagase H, Niikawa M, Kito H. The effect of several antipyretic analgesics on mitomycin C-induced mutagenesis using the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Jpn J Toxicol Environ Health.* 1996;42:136.
133. Niikawa M, Nagase H. Effect of aspirin on DNA damage induced by MMC in *Drosophila*. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 2007;61:250-253.

- 134.** Hennekens CH. Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Am J Manag Care.* 2002;8:691-700.
- 135.** Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular disease. *J Hypertens.* 2000;18:655-73.
- 136.** Verhoye E, Langlois MR, Rietzchel E, De Buyzere M, Gillebert T, De Bacquer D, De Backer G, Bekaert S, van Oostveldt P, Segers P, Verdonck P, Langlois M. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk?. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):128-37.
- 137.** Mehta JL, Chen J, Yu F, Li DY. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2004;64:243-9.
- 138.** Kurban S, Mehmetoglu I. Effects of acetylsalicylic acid on serum paraoxonase activity, Ox-LDL, coenzyme Q₁₀ and oxidative stress markers in healthy volunteers. *Clinical Biochemistry,* 2010;43:287-290.
- 139.** Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology,* 2011;668:15-24.
- 140.** Grosser N, Schröder H. Aspirin Protects Endothelial Cells From Oxidant Damage Via The Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003;23:1345-1351.
- 141.** Smith C, Marks AD, Lieberman M. Marks' Basic Medical Biochemistry. Section Four/Fuel Oxidation and the generation of ATP. Second Edition. Page 440.
- 142.** Aksoy N, Dogan Y, İriadam M, Bitiren M, Uzer E, Ozgonul A, Aksoy S. Protective and therapeutic effects of licorice in rats with acute tubular necrosis. *J Ren Nut.* 2012; 22(3):336-43.