

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

HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA ÇÖREK OTU
(NİGELLA SATİVA) ve SARIMSAK (ALLİUM
SATİVUM) EKSTRAKTLARININ DNA HASARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM BEKTAŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDURRAHİM KOÇYİĞİT

ŞANLIURFA
2010

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

**HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA ÇÖREK OTU
(NİGELLA SATİVA) ve SARIMSAK (ALLIUM
SATIVUM) EKSTRAKTLARININ DNA HASARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM BEKTAŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDURRAHİM KOÇYİĞİT**

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 905 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA
2010**

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince, benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni bu çalışmaya teşvik edip yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, ilgi ve anlayış ile eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten AKSOY ve Öğr. Gör. Hakim ÇELİK'e teşekkür ederim.

Bu tez ile ilgili desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Bora ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca benimle tecrübe ve birikimini paylaşan, bana yardımlarını esirgemeyen Uz. Dr. Ali Rıza OCAK ve Abdullah TAŞKIN'a da teşekkür ederim.

Bu tezin yapılmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumuna teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen babam Mustafa BEKTAŞ ve annem Emine BEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Gösterdiği özveri ve desteklerinden dolayı eşim Ferah BEKTAŞ'a ve gülümsemeleri ile bana güç veren kızlarım Nursima ve Melike Ceren BEKTAŞ'a sevgilerimle...

İbrahim BEKTAŞ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu.....	3
2.2. DNA Hasarı Oluşum Nedenleri.....	7
2.3. DNA Hasarı Tipleri.....	9
2.4. DNA Tamiri.....	17
2.5. Serbest Radikaller.....	25
2.6. Antoksidan Savunma Sistemleri	34
2.7. Çörek Otu.....	41
2.8. Sarımsak.....	49
2.9. Hücre Kültürü.....	52
3. MATERYAL VE YÖNTEM	56
3.1. Materyal	56
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	56
3.1.2. Mononükleer Lökositler	57
3.1.3. Besiyeri	57
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	57
3.1.5. Hazırlanan Tampon.....	58
3.2. Metot.....	58
3.2.1. Sarımsak ve çörek otu ekstraktlarının hazırlanması.....	58
3.2.1.1. Ezilip kaynatılarak elde edilen sarımsak ekstraktı (EKS).....	59
3.2.1.2. Kaynatılıp ezilerek elde edilen sarımsak ekstraktı (KES).....	59
3.2.1.3. Toz halde elde edilen sarımsak ekstraktı (THS).....	60

3.2.1.4. Kaynatılıp toz haline getirilerek elde edilen sarımsak ekstraktı (KTS)..	60
3.2.1.5. Ticari sarımsak yağı (TSY).....	61
3.2.1.6. Ezilip kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi (EKÇO)...	61
3.2.1.7. Ezilmeden kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi (KÇO)...	62
3.2.1.8. Ticari çörek otu yağı (TÇY).....	62
3.2.2. Sarımsak ve çörek otu ekstraktları konsantrasyonlarının ayarlanması.....	62
3.2.3. Lökositlerin süspansiyonu.....	63
3.2.3.1. Mononükleer Lokositlerin İzolasyonu	63
3.2.3.2. Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanışı.....	64
3.2.3.3. Mononükleer Lökositlerin Sayımı.....	64
3.2.4. Kontrol Solüsyonlarının Hazırlanması	64
3.2.4.1. Pozitif Kontrol Solüsyonu.....	65
3.2.4.2. Negatif Kontrol.....	65
3.2.4.3. Pozitif Kontrol Ortamının Hazırlanışı.....	65
3.2.5. Hazırlanan ekstraktlar ve H ₂ O ₂ ile inkübasyonu	65
3.2.6. Alkali Tek Hücre Elektroforezi yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi	66
3.2.7. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite.....	70
3.2.8. Total Oksidan Seviye (TOS)	71
3.2.9. Yapılan İstatistiksel Analizler	72
4. BULGULAR	73
4.1. Mononükleer Lökosit Sayım Bulguları.....	73
4.2. Mononükleer Lökosit DNA Hasarı bulguları.....	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	87
6. KAYNAKLAR	92

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. DNA'nın çift sarmallı yapısı.....	4
Şekil 2.2. Adenin, Guanin, Sitozin, Timinin molekül yapıları.....	4
Şekil 2.3. İnsan genomundaki kromozomlar.....	5
Şekil 2.4. DNA'da replikasyon oluşumu.....	6
Şekil 2.5. DNA Hasarı nedenleri.....	8
Şekil 2.6. Deaminasyon oluşumu	11
Şekil 2.7. Deamine bir bazın tamir edilememesi durumundaki nokta mutasyon.....	11
Şekil 2.8. Depürinasyon oluşumu.....	12
Şekil 2.9. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri.....	13
Şekil 2.10. Çift İplik Kırıkları (DSB).....	15
Şekil 2.11. 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'nun oluşum mekanizmaları.....	16
Şekil 2.12. DNA Hasarı sonucu oluşan süreç.....	18
Şekil 2.13. Fotoreaktivasyon mekanizması.....	19
Şekil 2.14. Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması.....	21
Şekil 2.15. Hatalı Eşleşme Onarım (Mismatch Repair) Mekanizması.....	22
Şekil 3.1. Etidyum Bromid ile Boyanmış DNA ların floresan mikroskop görüntüsü.....	69
Şekil 3.2. Meydana gelen DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altındaki görüntüleri.....	70
Şekil 4.1. Farklı Dilüsyonda EKS, KES, THS, KTS Ekstraktları ve Pozitif Kontrol DNA Hasarı.....	76
Şekil 4.2. , KÇÖ Ekstraktlarının Farklı Dilüsyonları ve Pozitif Kontrol DNA Hasarı.....	77
Şekil 4.3. TSY, TÇY Ekstraktlarının Farklı dilüsyonlarında DNA Hasarı.....	78
Şekil 4.4. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TAK ile ilişkisi...	80
Şekil 4.5. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TAK ile ilişkisi...	81
Şekil 4.6. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TOS ile ilişkisi...	82
Şekil 4.7. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TOS ile ilişkisi....	83
Şekil 4.8. Ortamda yalnızca sarımsak ekstraktları varken farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi...	84

Şekil 4.9. Ortamda yalnızca çörek otu ekstraktları varken farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi... 85

Şekil 4.10. Ortamda yalnızca Ticari Yağ varken yağların farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi.... 86

TABLULAR

Tablo 3.1. Hücrelerin maruz kaldığı ekstrakt konsantrasyonları.....	68
Tablo 3.2. Hücrelerin maruz kaldığı sarımsak yağı veya çörek otu yağı konsantrasyonları...	68
Tablo 4.1. Ekstraktlarının H ₂ O ₂ nin oluşturduğu DNA Hasarına Karşı Direnci.....	75
Tablo 4.2. TSY, TÇY Ekstraktlarının Mononükleer Lokosit DNA Hasarı.....	78
Tablo 4.3. Minimum DNA Hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TAK ile ilişkisi.....	79
Tablo 4.4. Minimum DNA Hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TAK ile ilişkisi.....	80
Tablo 4.5. Sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TOS ile ilişkisi.....	81
Tablo 4.6. Çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TOS ile ilişkisi.....	83
Tablo 4.7. Ortamda yalnızca sarımsak ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi.....	84
Tablo 4.8. Ortamda yalnızca çörek otu ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi.....	85
Tablo 4.9. Ortamda yalnızca Ticari Sarımsak Yağı ve yalnızca çörek otu yağı varken yağların farklı konsantrasyonlarında TAK ile ilişkisi.....	86

KISALTMALAR

A	Adenin
AMT	Allil mercaptan
BER	Baz Eksizyon Tamiri
C	Sitozin
Cl	Klor
CMV	Cytomegalo virüsü
DADS	Diallil disülfür
DAS	Diallil sülfür
DATS	Dialil trisülfid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
EKÇO	Ezilip kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi
EKS	Ezilip kaynatılarak elde edilen sarımsak ekstraktı
EM	Ekstraselüler matriks
ETS	Elektron transport sistemi
FBS	Fetal Bovin Serum (Fetal sığır serumu)
FCS	Fetal Chalf Serum
Fe	Demir
G	Guanin
GC	Guanilat Siklaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutation-S-Transferaz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
KÇO	Ezilmeden kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi
KES	Kaynatılıp ezilerek elde edilen sarımsak ekstraktı

KTS	Kaynatılıp toz haline getirilerek elde edilen sarımsak ekstraktı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LMP	Low melting point (Agaroz Jel)
Nm	nanometre
MDA	Malondialdehit
mG	O6-Metilguanin
mRNA	Messenger (Mesajcı) RNA
NER	Nucleotide Excision Repair (Nükleotid Çıkarma Onarımı)
NOS	Nitrik oksit sentaz
OSCs	Organosülfür
PBS	Phosphat Buffer Solution (Fosfat Tampon Solüsyonu)
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit distumulaz
tRNA	Translation (taşıyıcı) RNA
T	Timin
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TAS	Total Antioksidan Seviye
TÇY	Ticari çörek otu yağı
THS	Toz halde elde edilen sarımsak ekstraktı
TOS	Total oksidan seviye
TSY	Ticari sarımsak yağı
U	Urasil
UV	Ultraviyole
XDH	Ksantindehidrogenaz
XOD	Ksantin oksidaz
5-OH-Cyt	5-hidroksisitozin
5-OH-Ura	5-hidroksi urasil
8-OH-dGua	8-hidroksideoksiguanozin

ÖZET

Genom, DNA hasarına neden olan ekzojen veya endojen sayısız farklı etkene maruz kalır. Tüm organizmalar genetik materyallerini bu çevresel etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. Normal şartlarda DNA hasarı ile tamir denge halindedir. Bu dengenin bozulması durumunda, DNA'da meydana gelen hasar; genetik kararsızlığa, kontrollü hücre ölümüne veya kansere giden hastalıklara neden olmaktadır. Son zamanlarda DNA hasarını önlemeye yönelik araştırmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmada, farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak hazırlanan sarımsak (*Allium sativum*) ve çörek otu (*Nigella sativa*) ekstraktlarının hücre kültürü ortamında hidrojen peroksitin (H_2O_2) genotoksik etkisine karşı antigenotoksik ve antioksidatif aktivitelerini araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmada, mononükleer lokositler ile oluşturulan in vitro hücre kültürü ortamında H_2O_2 'nin indüklediği genotoksik etkiye karşı farklı konsantrasyonlarda sarımsak ve çörek otu ekstraktlarının potansiyel koruyucu etkilerini araştırdık. İnsan mononükleer lokosit hücrelerinin bulunduğu hücre kültür ortamında H_2O_2 'nin indüklediği DNA hasarına karşı sarımsak ve çörek otu ekstraktlarının potansiyel hasar önleyici etkileri alkalın tek hücre elektroforezi (Comet Assay) ile, antioksidatif özellikleri, total antioksidatif kapasite (TAK) ve total oksidatif kapasite (TOS) seviyelerinin ölçümü ile analiz edildi. Ortama ilave edilen sarımsak ekstraktlarından DNA hasarını en çok azaltan dozun 6.22 mg/dl ile kaynatılmış ezilmiş sarımsak ekstraktı olduğu, çörek otu ekstraktlarından ise 1.56 mg/dl ile ezilmiş kaynatılmış çörek otu ekstraktının olduğu bulundu. Bu konsantrasyonlarda antioksidatif kapasite en yüksek seviyede idi. Bu sonuçlar göstermektedir ki sarımsak ve çörek otu ekstraktları yüksek antioksidatif aktiviteye sahiptirler ve DNA hasarına karşı güçlü bir direnç oluşturmaktadırlar.

Anahtar sözcükler: Hücre kültürü, DNA hasarı, sarımsak (*Allium sativum*), çörek otu (*Nigella sativa*), Oksidatif durum

ABSTRACT

Investigation of the effect of *Nigella sativa* and *Allium sativum* extracts on DNA damage at the cell culture environment

Genome is under attack of multiple endogenous and exogenous factors which lead to DNA damage. All organisms have DNA repair mechanisms to protect their genetic material from damages caused by environmental factors. In normal condition, there is a balance between DNA damage and repair. If this balance failed and DNA damage increase, it can be resulted in genetic instability, apoptosis and many of cancer types. Lately, researches to protect DNA damage have come into prominence. Study describes the antioxidant activities and antigenotoxic effects of garlic and nigella sativa extracts, prepared by different processing methods, against the genotoxic effects of hydrogen peroxide (H_2O_2). We have examined the protective potential effects of (Garlic) and *Nigella sativa* extracts against H_2O_2 -induced genotoxic effects on human mononuclear leukocyte under in vitro conditions. The antigenotoxic effect of the *Nigella sativa* and *Allium sativum* extract on DNA damage induced by H_2O_2 in human mononuclear leukocyte was evaluated by alkaline single cell electrophoresis (Comet assay). The antioxidants properties were evaluated by determining total antioxidative capacity (TAK), total oxidative capacity (TOS) levels. Pretreatments with garlic extracts produced the best reductions in DNA damage at the concentration of 6.22 mg/dl for boiled and crushed garlic and, 1.56 mg/dl for crushed and boiled *Nigella sativa* extract. Antioxidative capacity is also highest in these extracts. These results suggested that garlic and nigella sativa extracts have significant antioxidant activity and protective effect against DNA damage.

Key words: Cell culture, DNA damage, *Allium sativum*, *Nigella sativa*, Oxidative status

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Canlının bütün genetik bilgilerini deoksiribonükleik asit (DNA) molekülü ihtiva eder. DNA'da meydana gelen olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değiştirebilir. İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir. DNA hasarını oluşturan nedenlerin en başında, çevresel şartlar, sürekli artan sanayi ve teknolojik atıklar, eksoz dumanı, sigara gibi faktörler gelmektedir. Canlının her bir hücresinde günde onbinlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. 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.

Çevresel faktörlerle birlikte alınan diyetel faktörlerin de DNA hasarı oluşumunda önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Diyetle alınan bazı gıdalar DNA hasar oluşumunu artırırken, bazı gıdaların DNA hasar oluşumunu önlediği bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda sarımsak (*allium sativum*) ve çörek otunun (*nigella sativa*) bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri yanında birçok faydalı etkilerinin olduğu, fitoterapide yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle vücudu, serbest radikallerin yol açtığı hasardan koruma yeteneğindeki maddelerin keşfedilmesine yönelik yoğun bir ilgi vardır (1). Yapılan

çalışmalar, antioksidan aktiviteye sahip kimyasalların, bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir. Bu kimyasalların, çeşitli dejeneratif hastalıkları engellemedeki rolü belirlenmiştir (2). Özellikle polifenolik fitokimyasalların antibakteriyel (3), bağışıklığı düzenleyici, karaciğer hasarını önleyici (4), antitümör (5) ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu (6) gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, antioksidan bileşiklerin büyük bir kısmında anti-inflamatör, anti-aterosklerotik, anti-tümör, anti-mutagenik, antibakteriyel veya anti-viral aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Doğal antioksidanların vücuda alınması; kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıkların riskinin azalmasıyla doğrudan ilişkilidir (7). Tıbbi bitkiler; çoğunluğu yüksek antioksidan aktivite gösteren polifenoller, flavonoidler, C vitamini, E vitamini ve karotenoidler (8), quinonlar, kumarinler, lignanlar, alkaloidler, aminler gibi serbest radikalleri temizleyen birçok antioksidan çeşidine sahiptir (7).

Son yıllarda yapılan çalışmalar fitokimyasal bileşiklerin kansere karşı kullanım alanının yaygınlaştığı bilinmektedir. Fitokimyasal bileşiklerden örneğin alkaloidler ve fenolik bileşiklerin özellikle kanser veya tümör önleyici aktivite göstermeleriyle, karotenoidler ise kanser engelleyici etkileriyle ön plana çıkmaktadırlar. Soya fasulyesi ve legümenlerde bulunan isoflavonoidler, kanser hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olduğu ve aynı zamanda angiogenez olayını da inhibe ettiği ayrıca, endotelial büyüme faktörünü durdurarak tümör büyümesini engelleyerek, apoptozise yol açtığı gösterilmiştir. Alkaloidlerin, hücrede DNA ya etki ederek kanserli hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini engellediği, bunun dışında fenolik bileşiklerin, daha çok hücre döngüsü kontrol proteinleri ve apoptozis mekanizmasının uyarılması üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (9).

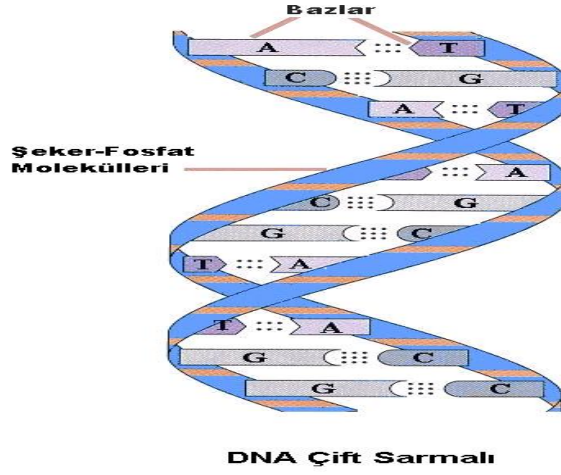
Bu çalışmada amaç, mononükleer lokositler ile oluşturulan hücre kültürü ortamında fitoterapide yaygın olarak kullanılan çörek otu (*nigella sativa*) ve sarımsak (*allium sativum*) ekstraktlarının DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu

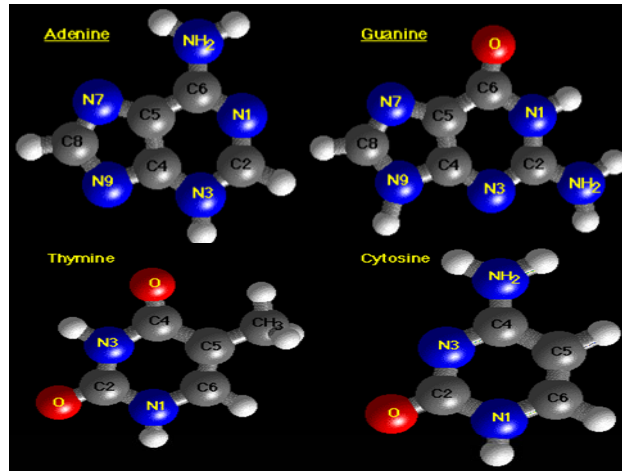
İlk defa A.F.Miescwer adlı bir araştırıcı 19. yuzyılın sonlarında hre çekirdeğini incelerken DNA molekülünü fark etmiştir. J Watson, Cambridge niversitesinden Francis Crick ile giriştiği çalışmalar sonuç vermiş ve 1953 yılında Nature dergisinde 900 kelimededen oluşan makalelerinin yayınlanmasıyla bilim adına önemli bir karanlık bölüm aydınlanmıştır. Ancak bu keşif içinde İngiltere King's Kolejinde Kristalograf olarak alışan Rosalinda Franklin'in de katkısı büyüktür. DNA'nın çift sarmal olduğunun bulunmasında Rosalinda Franklin'in X ışını resimleri kilit rol oynamıştır (10). James Watson 1956'da Harvard niversitesi'nde Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Profesrlğne getirilmiş ve bugün halen hayattadır. 1962 yılında Dr.Crick'le DNA'nın 3 boyutlu yapısını keşfetmelerinden dolayı Nobel dlne layık bulunmuştur (11).

Kimyasal olarak DNA, nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur (12, 13). 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 (şekil 2.1).



Şekil 2.1. DNA'nın çift sarmallı yapısı

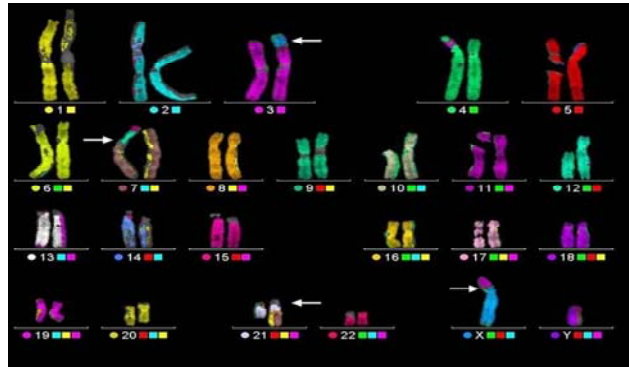
Bu birimlere, timin(T), adenin(A), sitozin(C) ve guanin(G) denir. Bunlar DNA molekülünün bir iplikçliğini oluşturur. İki iplikçik, yani merdivene benzer yapının iki kolu, karşılıklı gelen baz çiftleriyle birbirine bağlanır. Bu iki iplikçik birbirlerine ters yönde giderler. Her baz çifti tek bir şekilde eşleşebilir: Her zaman T ile A ve G ile C birleşir. Sarmalın dalına benzer her molekül, bir DNA "ipliği"dir. Bu iplikler birbirlerine kimyasal olarak bağlanmış nükleotidlerden oluşur. Nükleotidler ise bir şeker, bir fosfat ve bir de dört çeşit azotlu bazlardan birisinden oluşur. İşte bu nükleotidlerin DNA üzerinde sıralanışı, DNA dizilimini belirler. Genetik şifre de bu dizilimde yer alır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Adenin, Guanin, Sitozin, Timinin molekül yapıları

DNA, ökaryotlarda doğrusal kromozomlar, prokaryotlarda ise dairesel kromozomlar içinde bulunur. Kromozomlarda bulunan genler DNA yapısındadır. Her canlı bireyin ve neslinin hayat planı hücre hafızasını meydana getirir. DNA molekülleri şifrelerle kodlanmıştır. DNA'nın yapısına giren bazların (A,T,G,C) her biri şifre sembolü olarak kullanılır. Hayatın dili bu dört harfli alfabeyle DNA moleküllerinde yazılmaktadır. DNA'nın ipliklerinde ard arda gelen üç nükleotit bazı bir mana (şifre) ifade eder. Dört farklı nükleotide arka arkaya 64 şifre kodlanabilir (AAA, AAS, AAG, AGS, vb.). Şifrelerin DNA'daki sıralanışlarının değişmesiyle ise binlerce mana ifade edilebilir. DNA'nın omurgası boyunca bu bazların oluşturduğu dizi, genetik bilgiyi kodlar. Protein sentezi sırasında bu bilgi, genetik kod aracılığıyla okununca proteinlerin amino asit dizisini belirler. Bu süreç sırasında DNA'daki bilgi, DNA'ya benzer yapıya sahip başka bir nükleik asit olan RNA'ya kopyalanır. Bu işleme transkripsiyon denir.

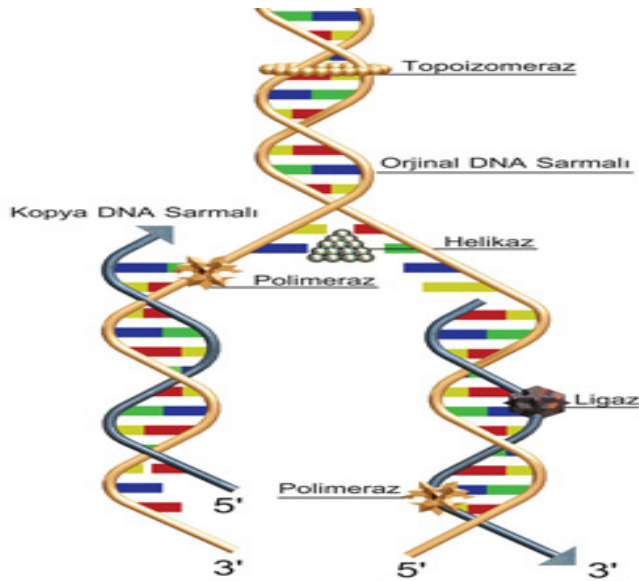
Bir hücredeki kromozomlar kümesine onun genomu denir. İnsan genomu 46 kromozom içinde yer alan yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşur (Şekil 2.3.) (14).



Şekil 2.3. İnsan genomundaki kromozomlar

Protein ve diğerk işlevsel RNA molekülleri kodlayan bilgi, gen adı verilen DNA parçalarının dizisinde yer alır. Genlerdeki genetik bilginin aktarılması baz eşleşmesi ile gerçekleşir. Örneğin, transkripsiyon sırasında bir DNA dizisinin ona komplementer bir RNA dizisi olarak kopyalanması, DNA ile doğru RNA nükleotitler arasındaki çekim ile mümkün olur. Protein çevrimi (translasyon) denen süreç sırasında bu RNA dizisine kaşılık gelen bir protein sentezlenirken, RNA nükleotitleri arasında gen ile baz eşleşmesi olur.

DNA hücre bölünmesinin hazırlıkları sırasında kendi kopyasını yapar. Kromozomların ikiye bölünmesi sırasında DNA molekölü kendisinin bir kopyasını yapar, buna replikasyon veya duplikasyon denir. Bu olay yavru kromozomda aynı kısımların bulunabilmesi için gereklidir. DNA'nın kendini eşlemesi esnasında, iki sarmal ipliğı bir arada tutan hidrojen bağları adeta bir fermuar gibi açılır (Şekil 2.4.).



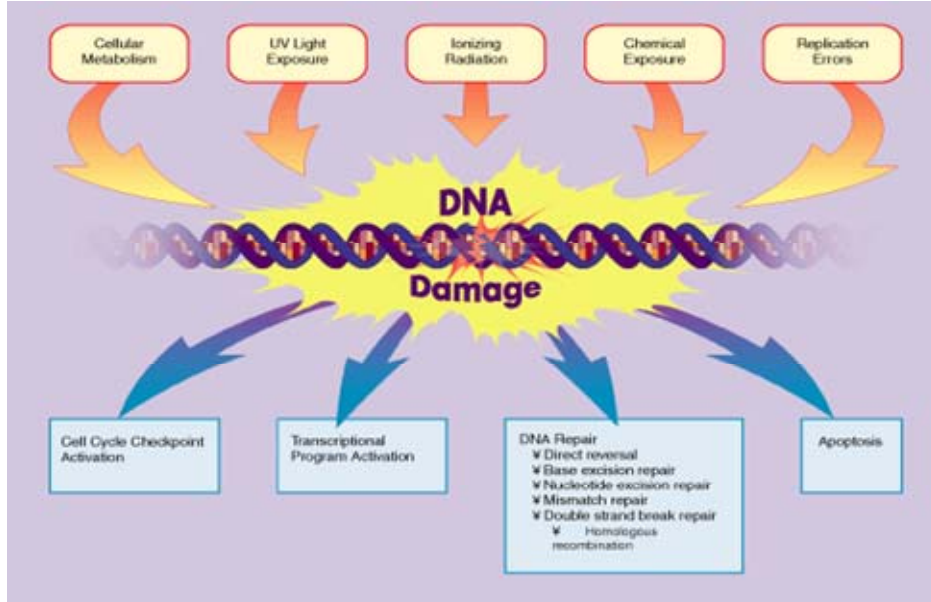
Şekil 2.4. DNA'da replikasyon oluşumu

Açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitlerin uçları, hücrede önceden sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanır. Böylece birbirinin aynı olan iki DNA meydana gelmiş olur. Hücre bölünmesinde her biri bir hücreye gider. Hücre mekanizması DNA ikili sarmalını birbirinden ayırıp her iki DNA ipliğini de yeni birer ipliği sentezlemek için şablon olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Yeni üretilen iplikler öncekilerle hemen hemen tamamen aynıdır, ancak mutasyon adı verilen hatalar oluşabilir. Hücrenin bu özelliğini laboratuvar ortamında taklit eden işleme de polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) adı verilir.

2.2. DNA Hasarı Oluşum Nedenleri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler “DNA hasarı” olarak adlandırılır. Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Ekzojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötik sayabiliriz. Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA'nın spontan değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V,D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz (Şekil 2.5).

DNA HASARI NEDENLERİ



Şekil 2.5. DNA Hasarı nedenleri

DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

1. Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları

2. Çevresel faktörler

- ❖ Ultraviyole Işık
- ❖ İyonize radyasyon
- ❖ Elektromanyetik dalgalar
- ❖ Kimyasal ajanlar : Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilliyici ajanlar, vinil klorid, v.b
- ❖ Sigara alkol kullanımı
- ❖ Hava kirliliği
- ❖ Kötü beslenme alışkanlığı

3. Doğal hücrel metabolizmadan kaynaklanan faktörler

- ❖ Mitokondriden enerji üretim esnasında oluşan Serbest Radikaller

- ❖ Enflamasyon
- ❖ Detoksifikasyon işlemleri

Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA hasarı ikileşme sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücrenin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir.

DNA Hasarı sonunda DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. Küçük hasarlar çoğunlukla DNA onarım sistemleri tarafından onarılabilirken, orta derecedeki hasarların birikimi ise mutasyon ve kanser ile sonuçlanabilir. Yüksek düzeydeki hasarlar ise apoptozisi uyarak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

2.3. DNA Hasarı Tipleri

DNA çeşitli farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutagenler arasında, yükseltgen (oksidleyici) etmenler, alkilleyici etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (morötesi ışık ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutagenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık timin ikilileri (timin dimerleri) oluşturarak DNA'ya hasar verir (15). Buna karşın, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler farklı türden hasar oluşturabilirler. Baz değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi (16). Her bir insan hücreinde

günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür (17, 18). Bu yükseltgeyici hasarlardan en zararlısı çift zincirli kırılmalardır. Çünkü bunların onarımı zordur. Bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir (19).

Başlıca hasar tipleri;

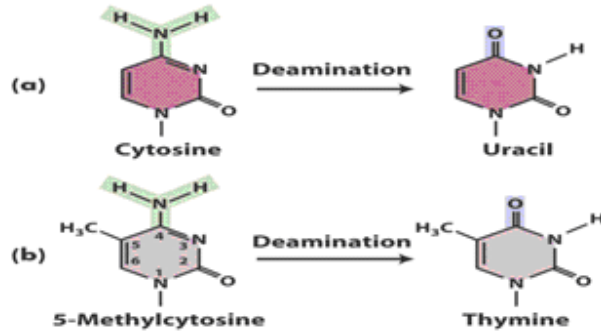
1. Deaminasyon
2. Depurinasyon
3. Alkilasyon
4. T-T and T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları (DSB)
7. Oksidatif hasardır.

2.3.1. Deaminasyon

Deaminasyonda, Adenin (A) ve Sitozin (C)'deki bir amino grubu, keto grubuna dönüştürülmektedir.

HNO_2 (nitroz asit) deaminasyon yoluyla Sitozin (C) => Urasil (U) ve Adenin (A) => hipoksantine dönüşmesine neden olur.

Adenin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin sitozinle yanlış eşleşir.



Şekil.2.6. Deaminasyon oluşumu

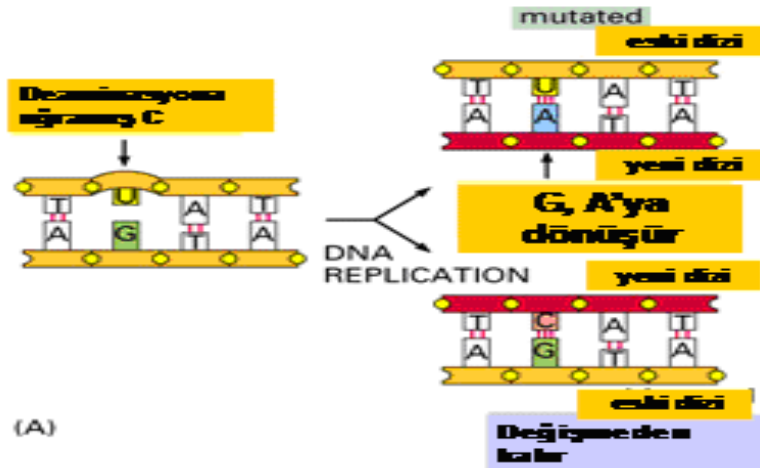


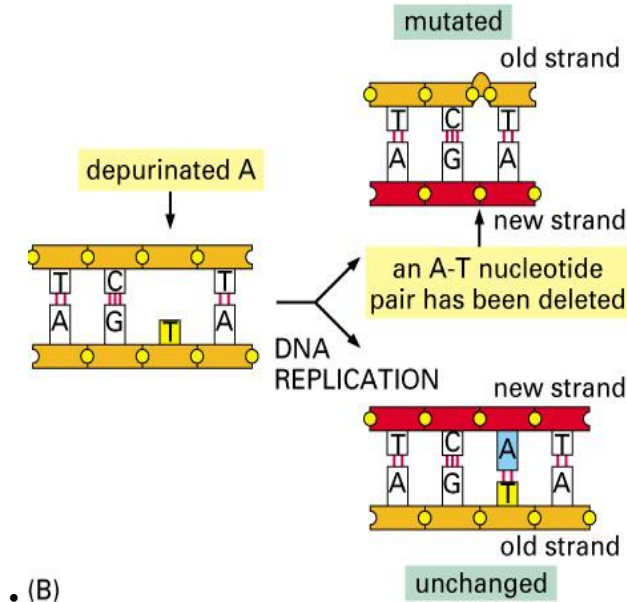
Figure 5-49 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Şekil.2.7. Deamine bir bazın tamir edilememesi durumundaki nokta mutasyon

2.3.2. Depürinasyon

Memeli hücreleri spontan olarak 37 derecede 20 saatlik bir üreme periyodunda yaklaşık 10000 purinini kaybeder. Aflatoksin depurasyonu indükler (purin bazı kaybı) ancak depurasyon spontan da olabilir. Depurine dizideki tamir eksikliği delesyonlara neden olabilir. Eğer bu mutasyonlar varsa replikasyon sırasında önemli DNA kayıplarına neden

olur. Baz olmayan yerin karşısına baz eklenemez veya buraya bir baz eklenir fakat bu baz, mutant bir baz olur.

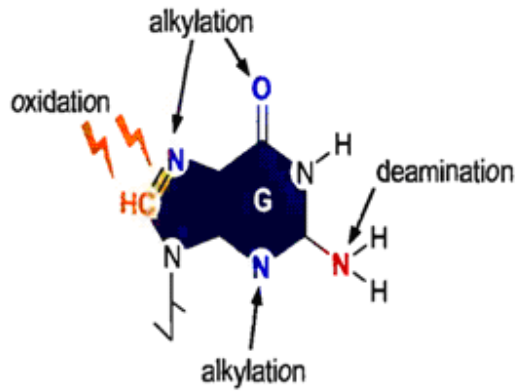


Şekil 2.8. Depürinasyon oluşumu

2.3.3. Alkilasyon:

Alkilasyon, nükleotidlerdeki amino ve keto gruplarına metil (CH₃ -) ya da etil (CH₃ - CH₂) gibi bir alkil grubu eklenmesi işlemidir. Nitrozaminler, etilmetilsülfonat ve N-metil-N1 -nitrosoguanidin en önemli alkilleyici ajanlardır. En önemli alkilasyon bölgesi, guaninin 6. karbon atomundaki oksijendir (31). Alkilasyon sonucunda oluşan O6 -etilguanin (ya da O6-metilguanin), adeninin baz analogu gibi davranarak timinle eşleşir. Bunun sonucunda hasarlı DNA replike olduğunda G:C baz çifti yerine A:T baz çifti geçer. Birçok kimyasal mutajen bazlarda modifikasyonlara neden olur. Bu ajanlar genellikle küçük alkilerdir (örneğin metil grupları). Aynı zamanda birçok mutajen polisiklik bileşenlerden oluşur.

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Böylece bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır.



Şekil 2.9. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri
(alkilasyon, oksidasyon, radyasyon)

2.3.4. T-T ve T-C dimerleri oluşumu

Nükleik asit bazlarının UV ışığı absorblaması sonucu sıklıkla yakın pirimidin bazlarının birer zincirleri arasındaki bağ oluşumu sonucu dimerler oluşur (siklobütan pirimidin dimerleri). DNA hasarı güneş yanığına ve melanin üretiminin artmasına neden olur ve tüm melanomaların %8 inden de sorumludur.

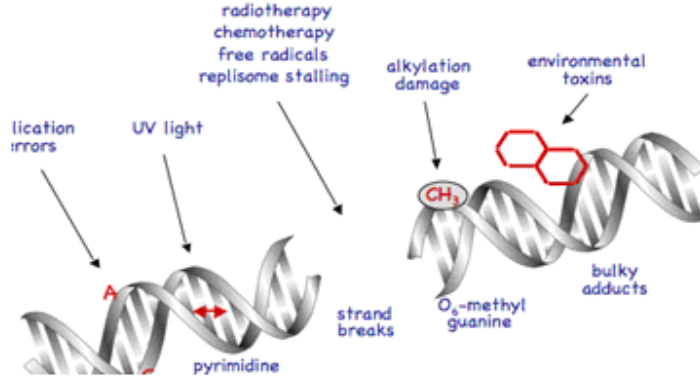
2.3.5. Replikasyon Hataları

DNA replikasyonu esnasında yanlış nükleotlerin eklenmesiyle oluşan hatalardır. DNA polimerazın hata yapma (yanlış bazı ekleme) sıklığı spontan mutasyon oluşumunu etkiler. Polimerazın doğruluk oranını etkileyen en önemli faktör, hata okuma (proofreading) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesidir. Bu aktivite, polimeraz tarafından yanlış eklenen bazların çıkarılmasına, böylece replikasyon esnasında mutasyon oluşumunu engellemeye yarar.

2.3.6. Çift İplik Kırıkları Oluşumu

İyonize radyasyon, transposonlar, topoisomerazlar, endonükleazlar, kromozomlar üzerindeki mekanik stres, tek iplikli bölgede tek iplik kesimi ile (örneğin replikasyon ve transkripsiyon sırasında) oluşurlar.

DSB'ler bir hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkan en tehlikeli DNA lezyonu türleridir. DSB'ler hem endojen hem de ekzojen unsurlardan kaynaklanabilir ve mutasyon oluşumuna, onkogenik dönüşüme ya da hücre ölümüne yol açabilecekleri için, genom için önemli bir tehlikedirler.



Şekil 2.10. Çift İplik Kırıkları

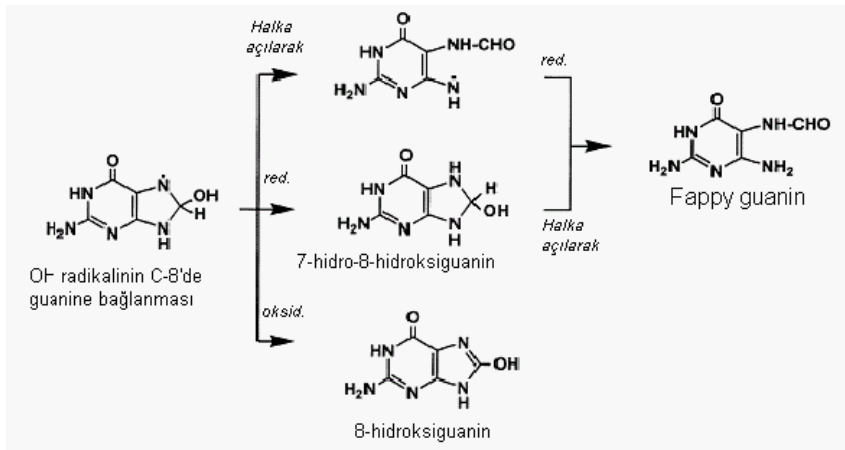
2.3.7. Oksidatif Stresin Neden Olduğu DNA Hasarı

Endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı tahmin edilmektedir. Serbest radikaller, DNA atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. 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 (20, 21).

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) ile, DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir (22). DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; Oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrikasid (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS türleri farklı

yollardan DNA hasarlarına neden olurlar. Örneğin O₂ ve H₂O₂ hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH radikali DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır (93). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (20, 21).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C₄, C₅ ve C₈ pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C₄-OH-, C₅-OH-, ve C₈-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır (21). C₄-OH- ve C₅-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C₈-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxopürinler) ve formamidopirimidinler oluşur(21). Şekil 2.11'de 8-hidroksiguanin (7,8-dihidroksi-8-oxoguanin:8-OH-Gua) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) oluşum mekanizmaları görülmektedir. Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin oluşumunu artırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kullanılmaktadır. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir (24).



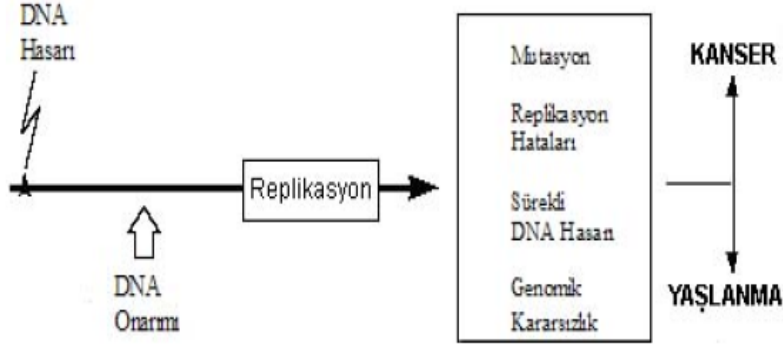
Şekil 2.11. 8-hidroksiguanin ve FapyGua'nın oluşum mekanizmaları

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır (25). Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C₄ merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. Cl merkezli radikallerin oksidasyonu ile şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker grubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluştururlar ve sonuçta zincir kırılmalarına neden olurlar. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikale moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağını kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C₅ merkezli peroksil radikali oksil radikale dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına, sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir (26).

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagezise, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır (27).

2.4. DNA Tamiri

DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (28).



Şekil 2.12. DNA Hasarı sonucu oluşan süreç

DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar.

2.4.1. DNA Tamir Mekanizmaları

1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)

- A- Fotoreaktivasyon
- B- O6-metilguanin tamiri
- C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

- A- Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)
- B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)
- C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

4. SOS Tamiri

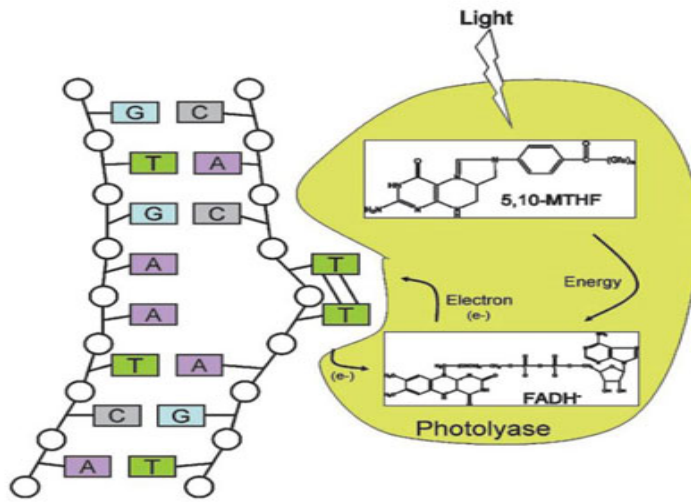
5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

- A- Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması (NHEJ)
- B- Homolog Rekombinasyon (HR)

2.4.1.1. Direkt Tamir Mekanizmaları

2.4.1.1.1. Fotoreaktivasyon

UV-ışığın etkisiyle meydana gelen pirimidin (veya pürin) dimerleri, görünür ışıkla aktif hale geçirilen bir enzim (*fotoliyaz*) tarafından yok edilmesi olayıdır. Fotoliyaz ışık enerjisini tutar ve örneğin timin dimerlerinin bulunduğu bölgede DNA'ya bağlanıp dimerler arasındaki kovalent bağları kırmakta kullanır; zarar görmüş bazları doğrudan eski biçimine döndürür (28, 29).



Şekil 2.13. Fotoreaktivasyon mekanizması

2.5.1.1.2. O6-Metilguanin Tamiri

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen

bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır.

2.4.1.1.3. Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturur.

2.4.1.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri

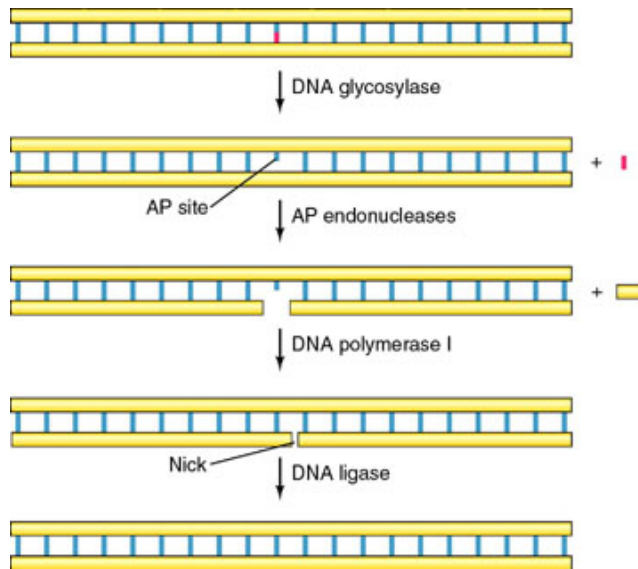
DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları olarak çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir. Tamir sistemi 3 temel basamak içerir:

- 1-Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.
- 2- DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.
- 3- DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.

2.4.1.2.1. Baz Eksizyon Tamiri (BER)

DNA bazlarının spontan hidrolizi veya kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir. Bu sistem DNA glikozilazlar tarafından yürütülür. Enzim şeker-baz arasındaki bağı keser ve apuridik ya da apirimidinik bölge oluşturur. AP endonükleaz denilen başka bir enzim, bazını kaybeden bölgede şeker-P arasındaki bağı keser.

Deoksiribofosfodiesteraz denilen başka bir enzim bazın kaybedildiği yerin çevresini temizleyerek DNA polimeraz enziminin rahat çalışmasına olanak verir. Bu enzim de boşluğu kalıp zinciri kullanarak doldurur. Zarara uğramış DNA ipliğinin kusurlu bölgenin iki tarafında kesen bir *endonukleaz* tarafından iplikte bir kırık meydana gelir. 5'→3' *eksonukleaz*ın iplikteki kusurlu bölgeyi yok edilir. Boşluğun bir tarafında oluşan 3'-OH grubunu primer olarak, tamamlayıcı dizileri taşıyan zinciri de kalıp gibi kullanan *DNA polimeraz* tarafından yeni bir iplik sentez edilir ve *DNA ligaz*ın yeni sentez edilen parçanın 3' ucunu eski ipliğe kovalent biçimde bağlanır (28).



Şekil 2.14. Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması

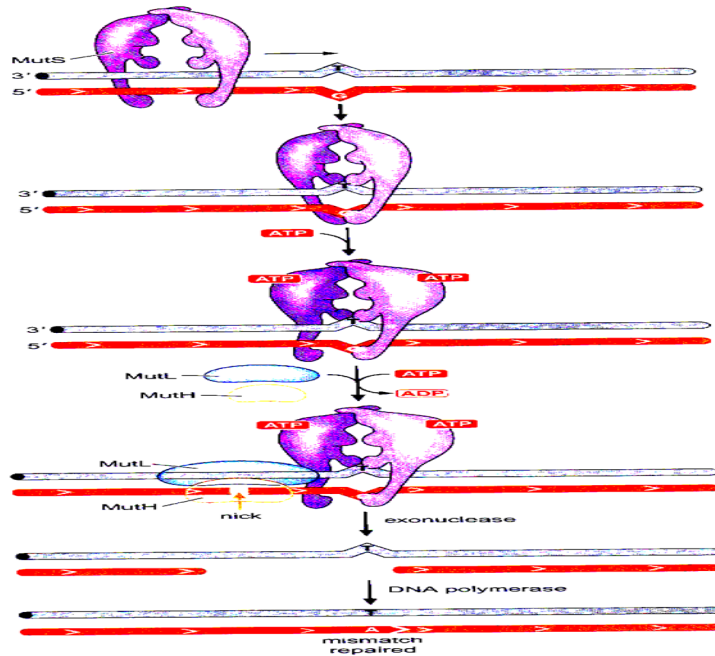
2.4.1.2.2. Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER)

Bilinen en genel ve etkili onarım mekanizmasıdır. Yeterince işlev görememesi yaşlanma, kanser oluşumu, çeşitli kalıtsal ve nörodejeneratif bozukluklar ile sonuçlanır. Nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının bozuk olduğu genetik geçişli nadir görülen üç sendrom tanımlanmıştır:

Kseroderma pigmentosum,
Cockayne sendromu,
Trikotiyodistrofi (28).

2.4.1.2.3. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair)

Yanlış eşleşme onarım protein dimeri (MutS) DNA'yı tarayarak omurgadaki bükülmeden yanlış eşleşmeyi bulur. MutS yanlış eşleşme taşıyan DNA'yı kuşatır. MutS-DNA kompleksi, MutL proteininin yapıya katılmasını sağlar. MutL yanlış eşleşmenin olduğu yerin yakınındaki bir zincirde bir kırılma (ya da çentik) meydana getirecek olan MutH enzimini aktifleştirir. Çentik oluşumundan sonra bir helikaz (UvrD) DNA'yı çözer ve bir ekzonukleaz zincirdeki büyükçe (1000-2000 nükleotid kadar) bir bölgeyi yok eder (28). Tek zincirli boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz tarafından kapatılır.



Şekil 2.15. Hatalı Eşleşme Onarım (Mismatch Repair) Mekanizması

2.4.1.3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

DNA hasarı diğerk tamir sistemleri ile tamir edilememişse, replikasyondan sonra aktif olan mekanizmadır. Bir lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyon yerine gelerek duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlar ve senteze devam eder. Rec A proteini, rekombinasyonel bir değış tokuş işleml ile hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Komplementer zincirde oluşan boşluk DNA polimeraz – DNA ligaz enzimleri sayesinde doldurulur.

2.4.1.4. Acil (SOS) Tamir Sistemi

DNA hasarının yüksek oranda olduğı ve diğerk tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. SOS yanıtında görev alan birçok proteini kodlayan genler normalde Lex A proteini tarafından baskılanmış durumdadır. DNA hasarı ile karşılaşıldığında, baskılanmış olan Rec A proteini hasarlı tek zincire bağlanır ve Rec A-ssDNA kompleksi oluşur. Rec A, DNA'ya bağlandıktan sonra Lex A proteininin otoproteolitik yıkımını aktive eder. Rec A, DNA polimeraza bağlanır ve lezyonu da geçerek DNA'yı replike etmesini sağlar. Rec A'nın, polimerazın 3'-->5' ekzonükleaz aktivitesini inhibe etmesiyle translezyon replikasyon gerçekleşir. Hataya meyilli tamir sistemidir.

2.4.1.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

Çift zincir kırıkları spontan oluşur ve genellikle hücrenin reaktif oksijene yanıtı olarak ortaya çıkar ve iki ayrı mekanizma bu potansiyel ölüm lezyonlarını düzeltir. Çift zincir kırıkları düzeltilmediğinde kromozom aberasyonlarına ve kanser öncesi evreye geçişe neden olabilir.

DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir. Bunlar serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog end joining) (NHEJ) ve homolog rekombinasyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir.

2.4.1.5.1. Homolog Olmayan Uç Birleşmesi

Eğer bölünmeyen bir hücrede çift zincir kırıkları oluşmuşsa kardeş kromatidler de kalıp olarak kullanılamaz ve bu kırıklar hiç tamir edilmemektense hatalı da olsa, hatta bazı baz dizileri kayıp bile olsa tamir edilirler.

2.4.1.5.2. Homolog Uç Birleşmesi

Çift iplik kırıkları onarımının daha etkili bir yoludur. Homolog rekombinasyon kardeş kromatidleri kullanarak çift zincir kırıklarını onarır. Bu nedenle onarım hatadan arınmış bir onarımdır. Sağlam DNA'daki dizi bilgisi bir genel rekombinasyon mekanizması ile çift iplik kırığı olan bölgeye taşınır. Reaksiyon, eşleşen DNA dizilerini tanıyıp bir araya getiren rekombinasyon proteinlerini gerektirir.

Bu komplementer dizi onarım reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacaktır. Komplementer dizi bulunduktan sonra homolog hasarlı ve hasarsız DNA arasında birleşik bir molekül yapısı oluşur. Hasarlı dizideki kaybolan dizi kardeş kromatiddeki diziden kopyalanır.

2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler. Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğerine). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar (32, 33).

2.5.1. Reaktif oksijen türleri

Serbest radikallerin birçoğu reaktif oksijen türleri olup en önemlileri aşağıdadır.

1. Hidrojen peroksit
2. Süperoksit radikali

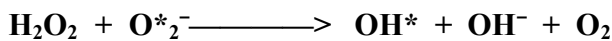
3. Hipokloröz asit
4. Singlet oksijen
5. Hidroksil radikali
6. Alkil radikali
7. Peroksil radikali
8. Organik peroksit radikali
9. Perhidroksil radikali
10. Alkoksil radikali

2.5.1.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (34, 35).

2.5.1.2. Süperoksit radikalleri ($O^*_{2^-}$)

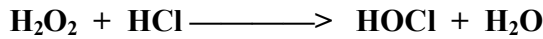
Süperoksit radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının oksidasyonu ile üretilmektedir. Süperoksit oluşumu elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir (36). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO^{\cdot} radikalini oluşturmaktadır.



Üretilen bu OH* radikalleri oldukça reaktif olup hücrede önemli hasarlara yol açar. O₂ radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H₂O₂ ve O₂ oluştururlar.

2.5.1.3. Hipoklorik asit (HOCl)

Hipoklorik asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O₂⁻'i oluştururlar ve daha sonra dismutasyonuyla oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonuyla birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



2.5.1.4. Singlet O₂

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal olarak değil ancak serbest radikal reaksiyonları başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit

radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonunda da oluşabilir (37).

2.5.1.5. Hidroksil radikali (OH*)

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (X-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, OH'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (34, 38, 39).

2.5.2. Reaktif nitrojen türleri (NO, NO₂, NO⁻, NO⁺)

Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türevlerinin en önemlisi oksidasyon değeri +2 olan nitrik oksittir. NO; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına

uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO'nın yarı ömrü 10-20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO₂) oluşturur (40).

2.5.3. Başlıca serbest radikal oluşum kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini artırır. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiyol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluşturur (41, 42).

2.5.3.1. Endojen serbest radikal üretim kaynakları

- ❖ Mitokondrial elektron transport zinciri
- ❖ Endoplazmik retikulum
- ❖ Redoks döngüsü
- ❖ Araşidonik asit metabolizması
- ❖ Fagositik hücreler
- ❖ Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksijen enzimler
- ❖ Otooksidasyon reaksiyonları

2.5.3.1.1. Mitokondriyal elektron transport sistemi

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (43).

2.5.3.1.2. Endoplazmik retikulum

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise

su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler (44).

2.6.3.1.3. Redoks döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar. Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intra sellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (45).

2.5.3.1.4. Araşidonik asit metabolizması

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve proteinkinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından

katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur. Araşidonik asid oksidasyonu, başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipit peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder. Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler (46).

2.5.3.1.5. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar. Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler:

Trombositler, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH

Nötrofiller, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl

Eozinofiller, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl,

Makrofajlar, H_2O_2 , $O_2\cdot$, OH., HOCl, NO

2.5.3.1.6. Otooksidasyon

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az ya da çok otookside olurlar. Kolayca otookside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler. Bunlar arasında, Hemoglobin gibi metallo proteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran

lipitleri sayılabilir. Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece otooksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar (47, 48, 49).

2.5.3.1.7. Oksidan enzimlerin reaksiyonları

Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır. Üzerinde en çok çalışılan enzim Ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantindehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve bu şekilde dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksit anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H_2O_2 ve O_2 oluşturmaktadır (50).

2.5.3.2. Ekzojen serbest radikal üretim kaynakları

- ❖ Pestisitler
- ❖ Sigara dumanı
- ❖ Zehirli gazlar
- ❖ İlaçlar
- ❖ Karsinogen maddeler
- ❖ Radyasyon

2.6. Antoksidan Savunma Sistemleri

Antioksidan veya yükseltgeme önleyici, yağların otoksidasyonunu yavaşlatan maddedir. Canlılarda, kimyasal süreçler (prosesler), özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkileri minimum olur. Yaşama şansını yükseltir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemi” adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar. Savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır ve savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır (51).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

2.6.1. Enzimatik antioksidanlar

2.6.1.1. Süperoksit dismutaz

Süperoksit distumulaz (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD, O₂'nin dismutasyonu H₂O₂ molekülünü oluşturur. Oluşan H₂O₂ molekülü sitotoksik olduğundan yine endojen üretilen katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile serbest oksijen ve suya dönüştürülerek toksik etkisi ortadan kaldırılır (52, 53).

2.6.1.2. Katalaz

Katalaz, yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda vardır. H₂O₂ oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle veya H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır (53, 54).

2.6.1.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, hidrojenperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H₂O₂ nin redüksiyonunu katalizler (51).

2.6.1.4. Glutation-S-Transferazlar

Glutation-S-Transferazlar (GST) antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST'ların kanserojen, mutagen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Birçok pigment (bilirubin, hematin, bromsülfattalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisilik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler.

2.6.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, süperoksidi detoksifiye eden enzimdir. Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

2.6.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.6.2.1. Askorbik Asit

C vitamini, suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. C vitamini, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktif olmasını engeller. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur. C vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin antibakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlenmiştir. C vitamini, antioksidan etkileri yanında organizmada Fenton reaksiyonunda ferridemiri ferro demire indirgeyerek, hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu etkisi sebebiyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak kabul edilmektedir; fakat bu tip etkisi sadece düşük konsantrasyonlarda görülmektedir.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir. C vitamini lipid peroksidasyonunu başlatmadan peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur (55).

2.6.2.2. β -Karoten

β -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler. Genel olarak havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur. Karotenoidler insanda ince barsakta %5-50 oranında pasif diffüzyon ile emilir. Bu emilim oranı diyetdeki yağ miktarıyla ilişkilidir. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korur (55, 56).

2.6.2.3. Vitamin E (α -Tokoferol)

α -Tokoferol yağda çözünen ve zincir kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α -tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarırlar. Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır (57). Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (58). Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (59, 60).

2.6.2.4. Polifenoller

Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

Laboratuar araştırmaları, aydaki polifenollerin kanser oluşumunu önlemeye yardımcı olabildiğini ve var olan kanserin ilerlemesini engelleyebildiğini veya kanseri azaltıp yayılmasını önleyebildiğini göstermektedir. Bu etkinin, polifenollerin, DNA'nın zarar görmesine ve normal hücrelerin kanserli hücrelere dnuşmesine neden olan oksidasyonu engelleme ve kanserojik bileşimlerin habisliğini artıran enzim aktivitelerini kısıtlama yetisinden kaynaklandığı sanılmaktadır. İnsanlarda bulgulara yönelik belirli bir sonuç bulunmamaktadır; ancak gözleme dayanan kanıtlar, arada bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Aradaki bağlantı kanserde olduğu kadar güçlü olmasa da çayın kalp hastalığına karşı koruma sağladığını gösteren kanıtlar da mevcuttur. Bunun nedeni, çay polifenollerinin kan kolesterolünü ve tansiyonu düşürüp kalp krizine veya felce yol açabilecek pıhtıların oluşmasını engellemesi olabileceği düşünülmektedir.

2.6.2.5. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

2.6.2.6. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın

Fe(II)'yi Fe(III)'e oksitler. Seruloplazmin demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

2.6.2.7. Albümin

Albümin, kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler (43).

2.6.2.8. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir.

2.6.2.9. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir.

2.7. Çörek Otu

Çörekotu düğünçiçeğigiller (Ranunculaceae) familyasındandır, 20 den fazla türü vardır. Çörekotu bir yıllık otsu bir bitkidir, tohumlarından çoğalır. Kumlu gevşek toprakları sever, çiçeklenme dönemine kadar su ister daha sonra sulanmaz. Tohumları haşhaş bitkisinde olduğu gibi kozalak (kapsül) içerisinde olgunlaşır. Tohumları 2–3 mm. boyunda 3 yüzeyle mat olmayan siyah renklidir (61).

Bitkinin kapsül içerisindeki tohumu, besin olarak kullanılır. Bitki, ismini tohumlarının siyah renginden almıştır. Nigella kelimesi Lâtince siyahimsi mânâsına gelen nigellusdan türetilmiştir. Nigella sativa bitkisinin Türkçe karşılığı olarak çörek otu, ekilen çörek otu, kara çörek otu ve siyah kimyon isimleri kullanılmaktadır. Çörek otunun anavatanı Doğu Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Güney Avrupa'dır. Bu bitki, Türkiye'de bilhassa Afyon, Burdur, Isparta, Kütahya ve Konya yörelerinde üretilmektedir (62).

2.7.1. Çörek otu çeşitleri

Çörek otunun bilinen 16 türü vardır. Yaygın olarak bilinen üç türü vardır. Bunlar mısır çörekotu, şam çörekotu, kır çörekotudur. Mısır çörekotu 40–60 cm. boyunda beyaz çiçeklidir. Tohumları parmaklar arasında ovalandığında muskat, biberiye ve anason karışımı benzeri koku verir. Anadolu kökenli olan şam çörekotu 70–80 cm. boyundadır, çiçekleri parlak mavi renklidir. Tohumlarının kokusu çilek ve ananası andırır. Kır çörekotu 15–20 cm. boyundadır, çiçekleri kirli mavi yeşildir ve yabani olarak kendiliğinden yetişir. Kır çörekotu zehirlidir, kullanılmamalıdır (61).

Çörek otunun terkininin belirlenmesinde kullanılan kimyevi analiz usulleri çok çeşitli olduğundan, muhteviyatı konusunda çok net tespitler yoktur (63). Çörek otu tohumları, uçucu yağ (% 0,38-0,49), sabit yağ (% 30-40), protein (% 20-30), saponin, melantin, nigellin ve tanen ihtiva eder.

Çörek otu tohumunun kimyevi muhteviyatı, bitkinin hasat mevsimine, çeşidine ve yetiştirildiği iklime göre farklılık gösterir. Kahire yakınlarında yetiştirilen çörek otu tohumlarından elde edilen uçucu yağın, 67 bileşik ihtiva ettiği ve bu bileşenlerin miktarca en önemlilerinin p-simen, timokinon, a-pinen ve Æ-ÿ-pinen olduğu belirlenmiştir (64).

Çörek otu tohumlarında % 6,4 su, % 4 kül, % 32 yağ, % 20,2 ham protein, % 6,6 ham lif ve % 37,4 karbonhidrat bulunmaktadır (65). Çörek otu tohumlarında sabit yağın % 1,2 mistrik, % 8,4 palmatik, % 2,9 stearik, % 17,9 oleik, % 60,8 linoleik, az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerden oluştuğu bildirilmiştir (65). Çörek otu tohumunda ayrıca az miktarda B1, B2 ve B6 vitamini; proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler; iz elementler olarak bilinen ve organizmada pek çok önemli metabolik faaliyette rol alan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineraller de vardır. Çörek otu tohumlarındaki müessir madde (kristal hâlinde) nigellon, ancak 1959'da izole edilebilmiştir (66).

2.7.2. Çörek otu günlük hayatta kullanım yerleri

Çörek otu bazı unlu gıdalarda süs unsuru olarak kullanılırken, aynı zamanda aromatik (kokulu) özellikleri dolayısıyla bazı gıdalarda da lezzet vermesi amacıyla kullanılmaktadır. Çörek otunun tohum özsu ve yağının; böceklere, virüslere ve bakterilere karşı etkili olduğu, aynı zamanda Orta Asya da akrep, örümcek sokmalarına, kedi, köpek ısırıklarına karşı da kullanıldığı bildirilmektedir (67, 68, 69).

Çörek otu tohumunda bulunan ss-sitosterol; salgı aktivitesini artırma, kandaki kolesterol seviyesini düşürme gibi hususiyetlerle donatılmış bir molekül olduğu ve prostat büyümesinde tedavi edici ilâç olarak kullanıldığı belirtilmektedir (70).

2.7.3. Çörek otu üzerine yapılan çalışmalar

Mısır'da yetiştirilen çörek otunun bazı özellikleri ve yağ içeriğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada, çörek otu tohumunun yağ ve protein bakımından zengin bir kaynak olduğu, yağ asitlerinden linoleik, oleik, palmitik asitler yönünden iyi olduğu, aynı zamanda da iyi bir sterol kaynağı olduğu vurgulanmıştır (71).

Azcan ve ark. (72), yaptığı bir çalışmada, 3 farklı Türk çörek otu tohumu çeşidinin yağ asidi bileşikleri ve toplam protein içerikleri incelenmiştir. Sarı tohum %49.2, beyaz tohumda %36.8, mavi tohumda %33,60 yağ tespit edilmiştir. Yine yapılan analizlerde en önemli doymamış yağ asitleri linoleik asit (54,7-69,2%), oleik asit (16,1-19,4%) ve palmitik asit (10,6-16,3%) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar tohumun rengine göre değişmektedir. Bu sonuçlara göre besinsel elementler ve ağır metal içerikleri değerleri en fazla sarı tohumda bulunmuştur.

El-Kadı ve ark. (74), yaptıkları bir çalışmada, çörek otunun bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi olduğu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada, yardımcı T-hücrelerinin ortalama %72 oranında, doğal savaşı hücrelerin ise %74 oranında arttığı gösterilmiştir.

Çörek otunun lenf hücreleri ve akyuvarlardaki çoklu kök hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, çörek otu yağının cytomegalo virüsüne (CMV) karşı koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir (75).

Çörek otunun içeriğinde bulunan taymokinonun kanser tedavilerinde bazı toksik etkileri önleyebildiği gösterilmiştir. Böbreklere ve kemik iliğine belirgin toksik etkileri olan cisplatine adlı kemoterapi ilacı ile verildiğinde toksik etkilerde belirgin olarak azalma görülmektedir. Bu madde aynı zamanda karaciğeri ve böbrekleri karbon tetraklorid toksisitesine karşı da koruyabilmektedir. Çörek otunun bu etkileri göstermede antioksidan özelliğinin de önem taşıdığı ifade edilmektedir (76).

Çörek otundaki aktif bileşiklerden taymokinonun ve ditaymokinonun anti kanser ilaçlara dirençli tümörlerde, tümör hücrelerini baskıladığı gösterilmiştir. Çörek otu ile inkübe edilen kanser hücrelerinin büyümek için ihtiyaç duydukları fibroblast growth factor ve colagenase proteini üretmedikleri belirtilmekte ve böylece tümör gelişimi durdurulabilmektedir (76).

Yapılan başka bir araştırmada thymoquinone bileşiğinin mide kanserine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda çörek otu özünün kanserli tümörlere karşı etkili olduğu ve çörek otu çekirdeklerinden elde edilen ethanolün de bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilerinin de olduğu vurgulanmıştır (76).

Medenica ve ark. (77), yaptıkları bir çalışmada, Nigella sativa ekstraktının kanser hücrelerini öldürdüğü bildirilmiştir. Kemik iliğinin, Nigella sativa ekstraktı ile muamelesinden sonra bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin sayılarında artışa rastlanmış ve myelopoezisin (kan ve ilik oluşumu) uyarıldığı gösterilmiştir. Kanserli hastaların kanları, bu

bitkiye maruz bırakıldığında tümöre özgü antikorların üretiminde artış olduğu kadar makrofaj hücrelerinin sayısı ve aktivasyonunda da artış gözlenmiştir.

Kaya ve ark. (79), çörek otu tohumunun insan hücresel bağışıklık sistemi üzerine etkisini inceledikleri çalışmada çörek otu tohumunun insan bağışıklık sistemini güçlendirebileceğini ortaya koymuşlardır.

Zaoui ve ark. (80), fare ve sıçanlarda yapmış oldukları bir çalışmada çörek otu tohumu yağlarının toksitesini araştırılmıştır. Araştırmada hayvanlara 12 hafta boyunca 2ml/kg vücut ağırlığında ağızdan ve intraperitoneal olarak çörek otu verilmiştir. On iki hafta süren çalışma sonunda, çörek otu kullanılan farelerde karaciğer enzimlerinden ALT ve GPT seviyelerinde değişimler gözlemlenirken, kalpte, pankreasda, böbrekte ve karaciğerde histopatolojik değişimler görülmemiştir. Deneme gruplarının serum, kolesterol, trigliserit, glikoz seviyeleri ve lökosit sayılarında kontrol grubuna göre önemli derecede düşüş kaydedilmiştir. Bunun tersine hemotokrit ve hemoglobin seviyelerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Kontrol grubundaki farelere nispeten çörek otu tohumu uygulanan farelerde canlı ağırlık artışında bir yavaşlama görülmüştür. Araştırmacılar, çörek otu tohumunun terapötik dozları için geniş önlemler alınması gerektiğini vurgulamışlardır. Ayrıca hemoglobin metabolizmasındaki değişiklikler ve lökosit düzeylerindeki düşüşün dikkate alınması gerekliliği de vurgulanmıştır.

Çörek otunun bileşiminde bulunan maddelerden thymoquinon, doza bağlı olarak tromboksan B2 ve leukotriene B4, siklooksijenaz ve araşidonik asit düzeyini azaltarak ağrı kesici ve antiromatizmal etki göstermektedir. Muhtemelen supraspinal düzeyde gerçekleşen kappa opioid reseptör uyarısı da bu ağrı kesici etkiyi güçlendirmektedir (81, 82).

Mutabagani ve ark. (83), thymoquinonun eicosanoid üretimini durdurmak sureti ile antiinflamatuvar etki oluşturduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, tek başına thymoquinon uygulaması ile daha belirgin antiinflamatuvar etki elde etmişlerdir.

Al-Majed ve ark. (84, 85), domuzlarda yapmış oldukları çalışmada, çörek otu yağının antiinflamatuvar özelliği nedeniyle nefes borusu kaslarını genişlettiği ortaya çıkmıştır. Bu durum çörek otu yağının nefes darlığı tedavisine yardımcı olduğunu ortaya koymaktadır.

Nair ve ark. (86), *L. monocytogenes* üzerinde siyah çörek otu tohum yağının antibakteriyel etkisini incelemek amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, 3 ayrı agarlı petri kutusu kullanılmış, birinci petri içine sebze yağı, ikinci petri içerisine gentamisin içeren antibiyotik ve 3. petri içerisine ise çörek otu enjekte edilmiş ve her 3 petri kutusuna da *L.monocytogenes* enjekte edilmiştir. Petri kutuları 24 saat boyunca 37°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Deney sonucunda çörek otu yağının tüm *L.monocytogenes* çeşitlerine karşı güçlü bir antibiyotik etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Ağaoglu ve ark. (87), çörek otunun farklı yoğunluklardaki (100, 200, 400 ug/disk) ekstraktları *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. Coli* ve *Candida albicans* gibi patojen mikroorganizmalar üzerinde denenmiş ve çörek otunun *Staphylococcus aureus*'un gelişimini durdurduğu, ancak diğer mikroorganizmalar üzerinde tesirli olmadığını tespit etmişlerdir..

Ağa Han ve ark. (87), yapmış oldukları bir çalışmada, kandidiyasiz (*Candida albicans*) hastalığına yakalanmış fareleri çörek otu özümüyle tedavi etmişler, *Candida albicans* mantarlarının gelişiminde çok büyük oranda gerileme olduğunu görmüşlerdir.

Topozada ve ark. (88)., çörek otu yağının antibiyotiklerle karşılaştırmalı olarak etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada, antibiyotiklere dirençli olan Shigella (Shigella disenteria hariç), V.colera, E.coli infeksiyonlarında çörek otu yağının en az Ampicillin, tetracycline, cotrimasole, gentamicine, nalidixic asit kadar hatta sözü edilen antibiyotiklerden daha etkili olduğu ortaya konmuştur (89).

Hanafi ve ark. (90), çörek otunun antimikrobiyal etkilerinin olduğunu yapmış oldukları çalışma ile göstermişler. Aynı araştırmacılar, çörek otu yağının Stafilokokkus aureus ve Psödomonas aerogenosa infeksiyonlarına karşı da etkili bulmuşlardır. Ayrıca yağın streptomisin ve gentamisinle sinerjik etkili olduğu, spektinomisin, eritromisin, tobramisin, doksisisiklin, kloramfenikol, nalidiksik asid, ampisillin, linkomisin, kotrimoksazolle ise additif etkili olduğu gösterilmiştir.

Akhtar ve ark. (66), çocuklarda parazit infeksiyonlarında çörek otunun Niclosamide ile eşdeğer etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Al-Ghamdi (91), çörek otu çözeltisinin fareler üzerinde karaciğeri karbon tetraklorid adındaki zehirli maddeye karşı korumadaki etkisini ortaya koymuştur. Çörek otu verilen farelerde karaciğer enzim düzeyi daha düşük çıkmıştır. Bunun yanında karaciğer dokusu üzerine zehirli maddelerin etkisi ise daha az görülmüştür.

Meral ve ark. (92), karbon tetra klorid verilen farelerde çörek otunun antioksidan etkileri araştırılmıştır. Araştırma 60 fare üzerinde gerçekleştirilmiş ve farelere karın zarından (periton) girerek çörek otu yağı verilmiştir. Çalışma 45 gün sürdürülmüş ve sonuçta çörek otu yağının lipid peroksidasyon düzeyini düşürdüğünü, buna karşılık antioksidan maddeleri düzeyini ise artırdığını tespit etmişlerdir.

Türkdoğan ve ark. (93), şeker hastası yapılan 50 fare üzerinde streptozotocin maddesi vererek bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Fareler iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruba otuz gün süre ile her gün karın zarından çörek otu yağı verilmiştir. Diğer gruba ise çörek otu yağı içermeyen tuzlu bir sıvı verilmiştir. Araştırmacılar şeker hastalığına yakalanmış farelerde çörek otu yağının kanda şeker oranını düşürdüğünü ve insülin miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca çörek otu yağı, insülin salgılanmasından sorumlu pankreasta beta hücrelerini harekete geçirip, çoğaltmıştır. Çalışmanın sonucunda çörek otunun şeker hastalığının tedavisinde yardımcı olabileceği ortaya koymuşlardır.

Fararh ve ark. (94), çörek otu yağının şeker hastalığına yakalandırılan farelerde insülin salgısını arttırdığını tespit etmişlerdir. Farelerde çörek otu yağının kan şekeri seviyesinde düşmeye yol açtığı ortaya koymuşlardır.

Güler ve ark. (95), çörek otunun broilerlerin performansına etkisini incelemek için gerçekleştirdikleri araştırmalarında, antibiyotik yerine hayvanlara büyümeyi artırıcı farklı konsantrasyonlarda çörek otu verilmiştir. Araştırmada 360 tane ve 3'er günlük broilerler rastgele 6'şar gruba bölünmüş ve 6 farklı rasyon uygulanmıştır. Kırk iki günlük sürede günlük yem tüketiminde gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılığa rastlanılmamıştır. Gruplarda en yüksek canlı ağırlık artışı sırasıyla antibiyotik (60.96 gr.) ve %1 çörek otu katılan grupta 60.60 gr. gerçekleşmiştir. Aynı zamanda rasyona antibiyotik ve çörek otunun %1'lik katkısının yemden yararlanma oranını %5 ($P<0.05$) oranında artırdığı tespit etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, kanatlı rasyonlarında doğal büyümeyi uyarıcı madde olarak %1 çörek otunun kullanılabilceği kanaatine varmışlardır.

Denli ve ark. (96), bıldırcınlarda yumurta verimi ve kalitesi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 1 gr./ kg. çörek otu verilen grupta; yumurta verimi, yumurta ağırlığı, yumurta yüksekliğini daha yüksek bulmuşlardır. Buna rağmen canlı ağırlık değişiminde, yem alımında

bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Sonuç olarak 1 gr./ kg. çörek otu ekstraktının yumurtacı bıldırcınlarda kullanımı tavsiye edilmiştir.

2.8. Sarımsak

Liliaceae familyasına ait bir bitki olan sarımsak (*Allium sativum* L.), yaklaşık 5000 yıldır Mısır, Yunan, Hint ve Çin uygarlıkları tarafından bakterisidal, hipoglisemik, antitrombotik, antiatherosklerotik, antimutagenik ve antikanserogenik özellikleri nedeni ile pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (97). Ana yurdunun Orta Asya stepleri olduğu sanılmaktadır. Dünya üzerinde halen 300-400 çeşit sarımsağın yetiştiği bilinmektedir.

Yeşilimsi beyaz veya pembe çiçekli, otsu bir kültür bitkisidir. Nadir olarak tohum bağlar. Bu nedenle soğancık (diş)'larla üretilir. Sarımsak soğanı, beyaz veya pembemsi renkli, az sayıda soğancık (diş)'dan meydana gelir. 6-15 mm. arasındaki dişlerin hepsi bir arada bir kabuk tarafından sarılmışlardır. Çok kuvvetli bir kokusu ve yakıcı bir lezzeti vardır (62).

2.8.1. Sarımsak içeriği

Sarımsağın (*Allium sativum*) içeriğinde, bol miktarda su (% 65), fruktoz içeren karbonhidratlar (% 26-30), kükürt bileşikleri (% 1,1-3,5), protein (% 1,5-2,1), lif (% 1,5) ve serbest amino asitler bulunur. Ayrıca yüksek oranda saponin, fosfor, potasyum, kükürt, çinko, orta miktarda selenyum, A ve C vitaminleri ile az miktarda da kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, manganez ve B kompleks vitaminlerini içerir (98). Uçucu yağında özellikle allil disülfür bulunur. Bu bileşik kükürtlü bir amino asit olan alliin'in, alliinaz isimli enzim etkisi ile parçalanarak, allisin'i vermesi, allisin'nin de su veya su buharı ile allil disülfür'e dönüşmesi sonucu meydana gelir. Sarımsağa özel koku ve lezzetini veren taşıdığı kükürtlü

uçucu yağdır (54). Allisin, diallil disülfür (DADS) ve diallil sülfür (DAS) gibi etkin kükürt bileşikleri sarımsağın anti-kanser ve antioksidan özellikleriyle yakından ilişkilidir (98).

Sarımsakta bulunan aktif bileşiklerin, organosülfür (OSCs) bileşiklerinin bir türü olabileceği ileri sürülmektedir. Bu OSCs'lerin başlıca sülfür bileşenleri; allin, allicin, allylpropyl disulfide, sallylcysteine, vinyldithiines, S-allylmercaptocystein, diallil sülfid (DAS), diallil disülfid (DADS) ve dialil trisülfid (DATS), ajoene, alliksin, allil mercaptan'lar ve allil metil sülfid'lerdir. Ayrıca, enzim özelliği olan allinaz, peroksidaz, mirosinaz ve aminoasit özelliğinde olan arginin, temel element olarak selenyum, germanyum gibi elementler bulunmaktadır. Sarımsak OSCs'lerinin biyolojik etkilerini belirlemede rol oynayan faktörün, allil grupları ve sülfür atomlarının sayısı olduğu da sanılmaktadır (99).

Sarımsakta bulunan en önemli bileşiklerden biri olan allicin (diallyl thiosulfinate veya diallyl disulfide), sulu sarımsak ekstraktında bulunan temel thiosulphinat bileşiğidir. Etkisini ancak, sarımsak ezilince veya kesilince göstermektedir. Sarımsak kesilir, parçalanır veya ezilirse, sarımsak dişlerinin etrafını saran zarı parçalanır ve yapısında bulunan S-allilsistein sülfoksit (kokusuz bileşik olan allin olarak bilinir) allinase tarafından enzimatik olarak allicin'e dönüştürülür. Allicin, sarımsağın kendine has kokusundan sorumludur. Ancak kararsız bir bileşiktir ve mono, di ve trisülfidler ve ajoene gibi diğer bileşiklere kolayca dönüşebilir (100). Sarımsak homojenatında bulunan sülfür içeren diğer önemli bileşikler allylmethyl thiosulphanate, 1- prophenyl allyl thiosulphanate ve γ -L- glutamyl-S-allyl-L-sistein'dir (101).

Sarımsağın antioksidan etkisi hayvanlar ve insanlarla yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur. Önemli olan, sarımsaktan veya sarımsak ürünlerinden elde edilen bileşiklerden hangilerinin antioksidan etkisinin daha fazla olduğunun belirlenmesi ve bu bileşiklerin çeşitli patofizyolojik koşullarda etkin bir şekilde nasıl kullanılabileceğinin belirlenmesidir (107).

Sarımsağın hipolipidemik, antiaterosklerotik, hipoglisemik, antikoagülant, antihipertensitif, antimikrobiyal, antidod (ağır metal zehirlenmelerinde), hepatoprotektif ve bağışıklığı düzenleyici etkiler gibi bazı iyileştirici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (102).

İn vitro çalışmalar sarımsağın doza bağlı olarak serbest radikalleri yakalayabildiğini göstermektedir. Sulu sarımsak ekstraktının, tavşan karaciğer homojenatında bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) oluşumunu doza bağlı olarak engellediği ortaya konmuştur (104). İşlenmemiş sarımsakta bulunan başlıca metabolitlerden bir tanesi olan Allil mercaptan (AMT), triklorometil ve triklorometilperoksil serbest radikallerini yakalama yeteneğindedir (105). Sarımsağın antioksidan etkisinin kısmen NO (azot monoksit) üretimi arttırmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. NO, ksanthine oksidaz'ı inhibe ederek süperoksit radikalının üretimini engellemektedir (106).

Sarımsakta çok sayıda değişik fitokimyasal bileşikler vardır. Sarımsağın özellikle antioksidan özellikleri kükürt bileşiklerinden başka içerdiği flavonoidlerden de kaynaklanabilir. Flavonoidlerin diyetle alımı koroner arter hastalığı mortalitesi riskiyle ters yönde ilişkili bulunmuştur (108). Başka bir çalışmada da flavonoid tüketiminin izole LDL'nin lipid peroksidasyonuna yatkınlığını azalttığı rapor edilmiştir (109).

Sarımsağın karsinojenleri p450 enzim sistemini uyararak veya kükürtlü bileşiklerle bağlayarak da detoksifiye edebileceği, bağışıklık sisteminin baskılanmasını önleyerek de kansere karşı yararlı olabileceği söylenmektedir (108).

2.9. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda, tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Hücrelerin çoğaltılması, yapılabilecek deneylerin sayısını artırmayı, deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması, ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlar. Her aşamada üzerinde dikkatle durulan, hücrelerin canlılığıdır. Hücre kültüründe başarı, steril çalışma koşullarının sağlanabilmesinde yatmaktadır (110).

Bir hücre kültür laboratuvarında; steril çalışma kabini, CO₂ inkübatörü, CO₂ tankı, invert ışık mikroskobu, santrifüj, vakum hattı ya da pompası, malzemenin sterilize edilebileceği bir otoklav, hücrelerin saklanabilmesi için sıvı azot tankı temel cihazlardır. Otoklav ve sıvı azot tankı haricindeki sayılan malzemeler, tercihen penceresiz, toza kapalı, lavabo gideri olmayan bir odada konuşlanmalıdır (110).

2.9.1. Kaynaklarına göre kültürler

2.9.1.1. Primer kültürler

Hayvan ya da bitki hücreleri izole edildikten sonra kültüre edilirlerse primer kültür elde edilir. Bu anda hücre soyu "sonlu" (finite)'dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden;

deneyleri bu dönemde yapmak gereklidir. Primer hücrelerle çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz (immortalize) olabilirler; bu durumda, bir hücre soyu (cell line) elde edilmiş olur. Örnek olarak primer aortik, mikrovasküler ya da göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatositler, primer düz kas hücreleri verilebilir (110, 111).

2.9.1.2. Hücre soyları

Primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri, çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin az olması, sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir. Örnek olarak 3T3 fibroblastlar, L929, CHO, HL60 verilebilir.

Bir dokudan mekanik ya da enzimatik yöntemlerle izole edilen primer hücreler için 4 farklı gelişme aşaması belirlenmiştir. Bunlar; hücrelerin dokunun dışındaki bu in vitro ortama alışmaları, eksponansiyel çoğalma aşaması (yaklaşık 20.- 30. pasaja dek), hücrelerin giderek çoğalma hızının yavaşladığı durum, son olarak, hücrelerin yaşlandığı, çok zor bölündüğü ve ölmeye başladıkları aşamadır (110).

Deneyler eksponansiyel büyüme döneminde planlanmak, bu hücrelerin bir kısmı dondurularak, ilerdeki çalışmalar için saklanmalıdır.

Belirli sayıda pasajlanma sonrasında, primer hücreler ya ölür, ya da hücre soylarına dönüşürler. Bu dönüşüm, "in vitro transformasyon" olarak adlandırılır. Bu hücreler genellikle anöploiddirler, seruma az gereksinim, kontakt inhibisyonda azalma, tutunmaya olan gereksinimin zayıflaması gibi özellikleri, tümör hücreleri ile paylaşırlar (110, 111).

Hücreler, Türkiye'de, Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan, Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan, National Institute of Health (NIH) servislerinden elde edilebilir (110, 111).

2.9.3. Besiyerleri

Besiyerleri, inorganik iyon bileşimleri bakımından, dengeli tuz çözeltileridir. 1950'li yıllarda yayınlanmış olan Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve bunların zenginleştirilmiş formları; EMEM'e Dulbecco modifikasyonu (DMEM), Ham's F12, DMEM ve F12'nin 1:1 karışımı olan DMEM/F12, RPM1 1640, M199 en sık kullanılan çözeltilerdir. Bunlara eklenen diğer moleküller, esansiyel aminoasitler, vitaminler (özellikle B vitaminleri), hormonlar (insulin, hidrokortizon) ve glikozdur.

Büyüme çözeltileri pek çok dayanıksız madde içerdiklerinden, + 4 °C'de saklanmalı, ancak hücrelere eklenmeden hemen önce 37 °C'lik su banyosunda 10 dakika ısıtılmalıdırlar. Hücreler haftada iki kez büyüme çözeltileri değiştirilerek beslenmelidirler (110, 111).

2.9.4. Dondurularak saklama

Hücreler sıvı azot içinde -196 °C'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak özel plastik tüpler ya da cam vialler içinde saklanır. Hücreler, büyüme çözeltileri % 10–20 serum ve % 5-10 gliserol ya da DMSO içeren bir çözelti içine alınarak dondurulurlar. Bu sırada konsantrasyonları, 1:10 sulandırılarak çözüldüklerinde normal ekilme konsantrasyonunun “örneğin 10^5 hücre/ml” 5 katı olacak biçimde ayarlanmalıdır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. Laminar akım kabini (Heraeus)
2. CO₂ inkübatörü (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C) (LaboTect)
3. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
4. Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
5. Floresan invert mikroskop (Olympus)
6. Işık mikroskobu (Olympus)
7. ±4°C Buzdolabı (Profilo)
8. -20°C derin dondurucu (Uğur)
9. -80°C derin dondurucu (Revco)
10. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
11. Vorteks (Nüve NM 110)
12. Pipet tabancası (Boeco)
13. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson)
14. Otoklav (Nüve ot 032)
15. Hassas Terazi (Sartorius)
16. Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF)
17. Distile Su Cihazı (Nüve)
18. Elektroforez düzeneği (Biolab)

19. Hotplate (Thermolyne)
20. Vertex (Nüve)
21. Manyetik karıştırıcı
22. Benmori (Nüve)
23. pH metre (Hanna Instruments)
24. Thoma lamı (IsoLab)

3.1.2. Mononükleer Lokositler

Deney boyunca kullanılan hücreler sağlıklı, gönüllü bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde onam formu imzalatılarak alındı.

3.1.3. Besiyeri

DMEM Besiyeri: 13,4 gr/ml DMEM, 0,37 gr/ml sodyum bikarbonat (NaHCO_3) deiyonize su içinde çözüldü. 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) ile pH: 7,2 olacak şekilde hazırlandı. 0,22 μm 'lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı.

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65 $^{\circ}\text{C}$) agaroz jel (Sigma)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37 $^{\circ}\text{C}$) agaroz jel (Sigma)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
4. Sodyum klorür (Merck)
5. Potasyum Klorür (KCl) (Merck)

6. Trizma base (Sigma)
7. Triton X-100 (Sigma)
8. Sodyum hidroksid (Merck)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
11. Etidyum bromit (Sigma)
12. Hidrojen peroksit (Merck)
13. Trizma HCl (Sigma)
14. Histopaque-1077 (Sigma)
15. Giemza boyası (Merck)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba)
- 17 DMEM (Sigma)

3.1.5. Hazırlanan Tampon

PBS (Fosfat) Tamponu: 10 mM KH_2PO_4 ve 10 mM K_2HPO_4 solüsyonları hazırlandıktan sonra bir beher içinde pH= 7,2 olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan tampon solüsyonuna 0,15 M NaCl eklendi.

3.2. Metot

3.2.1. Sarımsak ve çörek otu ekstraktlarının hazırlanması (112)

Deneylerimizde kullanılan sarımsaklar kurutulmuş formda ve Şanlıurfa'da bir marketin manavından satın alınmıştır. Ekstraksiyon aşamasından önce bu sarımsakların kabukları soyulmuş ve hassas bir terazi kullanılarak her ekstrakt için 5 gr tartılmıştır.

Deneylelerimizde kullanılan sarımsak yağı, çörek otu ve çörek otu yağı ise Şanlıurfa'da bir baharatçıdan temin edilmiştir. Çörek otu ekstraktları için her ekstraksiyon işleminde 1 gr çörek otu hassas bir terazide tartılmıştır. Sarımsak numunelerinden dört ekstrakt ve çörek otu numunelerinden iki ekstrakt elde edilmiştir. Sarımsak yağı ve çörek otu dilüe edilerek direkt olarak kullanılmışlardır.

3.2.1.1. Ezilip kaynatılarak elde edilen sarımsak ekstraktı (EKS)

Bir hassas terazide 5 gr kuru sarımsak tartıldı ve sarımsaklar bistüri ile küçük parçalara bölündükten sonra boş bir cam tüpe alındı. 5 ml distile su eklendikten sonra bir mekanik homojenizatör ile sarımsaklar homojenize edildi. Homojenizat distile su ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra elde edilen karışım bir erlen içerisinde konularak 1 saat boyunca 100 °C'de bir ısıtıcıly manyetik karıştırıcıda bekletildi. Oda sıcaklığında soğumaya alınan homojenize olmuş sarımsak ekstraktının sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınıp stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.2. Kaynatılıp ezilerek elde edilen sarımsak ekstraktı (KES)

Bir hassas terazide 5 gr kuru sarımsak tartıldı ve sarımsaklar boş bir cam tüpe alındı. 10 ml distile su eklendikten sonra 1 saat boyunca 100 °C'de bir ısıtıcıly manyetik karıştırıcıda kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğumaya alınan haşlanmış sarımsak bir mekanik homojenizatör

ile homojenize edildi. Homojenize olmuş sarımsak ekstraktının sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.3. Toz halde elde edilen sarımsak ekstraktı (THS)

Bir mekanik parçalayıcı yardımı ile 50 gr kuru sarımsak küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış sarımsaklar bir kurutma kağıdı üzerinde açık havada 10 gr kalıncaya kadar kurutuldu. Kurumuş sarımsak parçaları bir havan yardımıyla toz haline getirildi. 1 gr toz formuna getirilmiş sarımsak üzerine 10 ml distile su eklendikten sonra bir gün inkübe edildi. Sarımsak ekstraktının sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.4. Kaynatılıp toz haline getirilerek elde edilen sarımsak ekstraktı (KTS)

Bir hassas terazide 50 gr kuru sarımsak tartıldı ve 10 eşit kısma (her bir kısma 5 gr olacak şekilde) bölündü. 5 gr tartılan sarımsaklar boş 10 adet cam tüpe alındı. Her tüpe 10 ml distile su eklendikten sonra 1 saat boyunca 100 °C'de bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatıldılar. Oda sıcaklığında soğumaya alınan haşlanmış sarımsaklar bir homojenizatör ile homojenize edildi ve bir araya getirildiler. Homojenize sarımsaklar bir kurutma kağıdı üzerinde bir gün boyunca açık havada kurutuldu. Kurumuş sarımsak parçaları bir havan

yardımıyla toz haline getirildi. 1 gr toz formuna getirilmiş sarımsak üzerine 10 ml distile su eklendikten sonra bir gün inkübe edildi. Sarımsak ekstraktının sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.5. Ticari sarımsak yağı (TSY)

Deneylelerimizde kullanılan sarımsak yağı Şanlıurfa'da bir baharatçıdan temin edilmiştir. Sarımsak yağı dilüe edilerek direkt olarak kullanıldı. Stok solüsyonu çalışma anında elde edildi. Sarımsak yağı suda çözülmediğinden 200 kat distile su ile dilüe edildikten sonra bir vorteks yardımıyla 30 dakika boyunca vortekslendi. Sonra bu stok solüsyonu daha ileri dilüsyonlarla çalışmada kullanıldı.

3.2.1.6. Ezilip kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi (EKÇÖ)

Bir hassas terazide 1 gr çörek otu tartıldı ve çörek otu bir havan yardımıyla ezildi ve boş bir cam tüpe alındı. Distile su ile 10 ml tamamlandıktan sonra 1 saat boyunca 100 °C'de bir ısıtıcı manyetik karıştırıcıda kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğumaya alınan ekstraktın sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.7. Ezilmeden kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi (KÇO)

Bir hassas terazide 1 gr çörek otu tartıldı ve boş bir cam tüpe alındı. Distile su ile 10 ml tamamlandıktan sonra 1 saat boyunca 100 °C'de bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğumaya alınan ekstraktın sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok ekstraktı +4 °C'de saklandı.

3.2.1.8. Ticari çörek otu yağı (TÇY)

Deneylerimizde kullanılan çörek otu yağı Şanlıurfa'da bir baharatçıdan temin edilmiştir. Çörek otu yağı dilüe edilerek direkt olarak kullanıldı. Stok solüsyonu çalışma anında elde edildi. Çörek otu yağı suda çözülmediğinden 200 kat distile su ile dilüe edildikten sonra bir vorteks yardımıyla 30 dakika boyunca vortekslendi. Sonra bu stok solüsyonu daha ileri dilüsyonlarla çalışmada kullanıldı.

3.2.2. Sarımsak ve çörek otu ekstraktlarının deneyde kullanılan konsantrasyonlarının hazırlanması

Deneylerimizde kullanılan her ekstrakt için 8 ayrı konsantrasyon hazırlandı. Bunun için sekiz ayrı tüp 1'den 8'e doğru numaralandırılıp her sonraki tüpteki ekstraksiyon konsantrasyonu iki kat dilüasyon ile ayarlandı. İlk tüp, her ekstrakt stok solüsyonu için 1/10 dilüasyon oranı ile dilüe edildi. Daha sonraki dilüasyonlar 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 ve 1/1280 oranında idi. Sarımsak ve çörek otu yağ stoku dilüasyonları 1/200 ile

başlandı. Daha sonraki dilüsyonlar 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800 ve 1/25600 oranında idi. Kullanım anında her 1000 µl hücre süspansiyonuna 10 µl dilüe edilmiş ekstrakt solüsyonları eklenerek işlem yapıldı. Bu işlemler hesaba katılarak hücrelerin maruz kaldığı ekstrakt konsantrasyonları tablolarda verilmiştir.

Tablo 3.1. Hücrelerin maruz kaldığı ekstrakt konsantrasyonları

Dilüsyon oranı	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Ekstraktın konsantrasyonu (W/V) (mg/dl)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39

Tablo 3.2. Hücrelerin maruz kaldığı sarımsak yağı veya çörek otu yağı konsantrasyonları

Dilüsyon oranı	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600
Yağlar (V/V) (µl /dl)	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15	0.07	0.035

3.2.3. Lökositlerin süspansiyonu

3.2.3.1. Mononükleer Lokositlerin İzolasyonu

Sağlıklı, gönüllü bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde 10 ml heparinli kan örneği alındı. Boş steril bir tüp içine 2 ml histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 2 ml taze heparinize kan yavaşça konuldu ve bu işlem 5 ayrı tüpe uygulandı. 2100 rpm'de 25°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabaka lökositler dışında kalan eritrosit, trombosit ve diğer şekilli elemanlardan oluşuyorken, orta tabakada lökositlerin içinde olduğu histopaque solüsyonundan ve en üst tabakada ise plazma kısmından oluşuyordu. Santrifügasyon sonrası orta tabakada biriken mononükleer lökositler 2 ml'lik pipet yardımıyla boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lökosit içeren histopaque üzerine 1 ml, 1 M PBS (fosfat tampon

solüsyonu) (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm'de 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lökosit pelleti elde edildi.

3.2.3.2. Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanışı

Elde edilen lökosit pelleti üzerine 10 ml DMEM besiyeri eklendikten sonra bir pipet yardımıyla lökositlerin besiyeri ortamına homojen dağılımı sağlandı. Elde edilen bu lökosit süspansiyonu ile hücre sayımı yapıldı.

3.2.3.3. Mononükleer Lökositlerin Sayımı

Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli lökosit hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından thoma lamı üzerine yaydırılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasında 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.

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

3.2.4. Kontrol solüsyonlarının hazırlanması

Her deneyde bir pozitif ve bir de negatif kontrol çalışması yapıldı.

3.2.4.1. Pozitif kontrol solüsyonu

100 ml'lik balon joje içerisinde distile su ile %30'luk H₂O₂ (Merck) solüsyonundan 10 mmol H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

3.2.4.2. Negatif Kontrol

Deneyimizde negatif kontrol olarak, herhangi bir ekstrakta veya H₂O₂'e maruz kalmayan bir hücre süspansiyonu kullanıldı.

3.2.4.3. Pozitif Kontrol Ortamının Hazırlanışı

Steril 25 ml'lik steril flasklara 10 ml DMEM besiyeri konulduktan sonra elde edilen mononükleer lökosit süspansiyonunda 1000 µl ve hazırlanan 10 mmolarlık H₂O₂ stok solüsyonundan 50 µl ilave edilerek karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan hemen sonra flask içeriği santrifüj tüpüne aktararak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra H₂O₂ içeren süpernatantlar döküldü. Tüplerin dibinde kalan lökosit pelletleri üzerine 5 ml DMEM besiyeri eklendi. Böylece H₂O₂ ve ekstraktlar ortamdaki uzaklaştırılmış oldu.

3.2.5. Hazırlanan ekstraktlar ve H₂O₂ ile inkübasyonu

25 ml'lik flasklara 10 ml DMEM besiyeri konulduktan sonra elde edilen lökosit hücre süspansiyonundan her flaska 1 ml olacak şekilde eklendi ve üzerine konsantrasyonları daha önce ayarlanmış ekstrakt solüsyonlarından 10 µl konuldu. Karışımlar 37°C'de 1 saat % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Daha sonra flasklara 10 µl 10 mmol H₂O₂ solüsyonu eklendi. Karışımlar 37°C'de 10 dakika % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe bekletildi ve hemen santrifüj tüplerine alınarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra H₂O₂ içeren süpernatantlar döküldü. Tüplerin

dibinde kalan lökosit pelletleri üzerine 1 ml DMEM besiyeri eklendi. Böylece H₂O₂ ve ekstraktlar ortamdaki uzaklaştırılmış oldu.

3.2.5.1. Lökositlerde H₂O₂ ile DNA hasarı oluşturulduktan sonra ekstraktlar ile inkübasyonu

25 ml lik flaslara 10 ml DMEM besiyeri konulduktan sonra elde edilen lökosit hücre süspansiyondan her flaska 1 ml olacak şekilde eklendi ve üzerine 10 µl, 10 mmol'luk H₂O₂ stok solusyonundan ilave edilerek 37°C'de 1 saat % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Daha sonra flaslara çeşitli formlarda hazırlanan ekstraksiyon solusyonundan 10 µl eklendi ve karışımlar 37°C'de 10 dakika % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe bekletildi ve hemen santrifüj tüplerine alınarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, H₂O₂ içeren süpernatantlar döküldü. Tüplerin dibinde kalan lökosit pelletleri üzerine 1 ml DMEM besiyeri eklendi. Böylece H₂O₂ ve ekstraktlar ortamdaki uzaklaştırılmış oldu.

3.2.6. Alkali Tek Hücre Elektrofözezi (Comet Assay) yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi

3.2.6.1. Yöntemin prensibi

Mononükleer lökosit DNA hasarı, Sigh ve ark. (113), Alkali tek hücre elektrofözezi (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agarozaya yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk)

oluşturmazlar. 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 (20-24). Elektroforezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

3.2.6.2. Yönteminin Uygulanışı

3.2.6.2.1. Slaytların Hazırlanması

% 1,0 'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanarak 80 µl kadar jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. Hazırlanan lamlar nemli kutularda bekletildi. PBS (Fosfat buffered saline) ile mm³ te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,5'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37°C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi. Üçüncü aşamada da aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir tabaka halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlandı (20-24).

3.2.6.2.2. Lizis aşaması

Hazırlanan slaytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletildi. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM trizma base ve %1 oranında triton X-100'den oluşmaktadır. Bu

solüsyonun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı (20-24).

3.2.6.2.3. Elektroforez tamponu

Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 20-30 dakika inkübasyona bırakıldı. Alkali çözeltisi 1mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit (pH <13) (20-24).

3.2.6.2.4. Elektroforezde yürütme

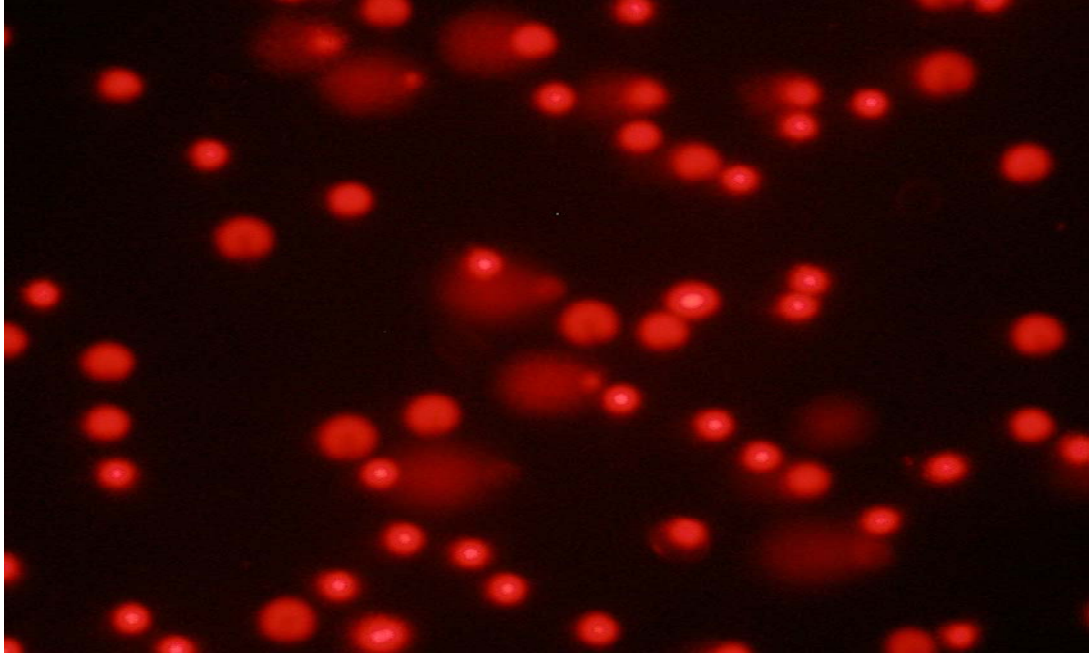
Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü (20-24).

3.2.6.2.5. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı (20-24).

3.2.6.2.6. Boyama

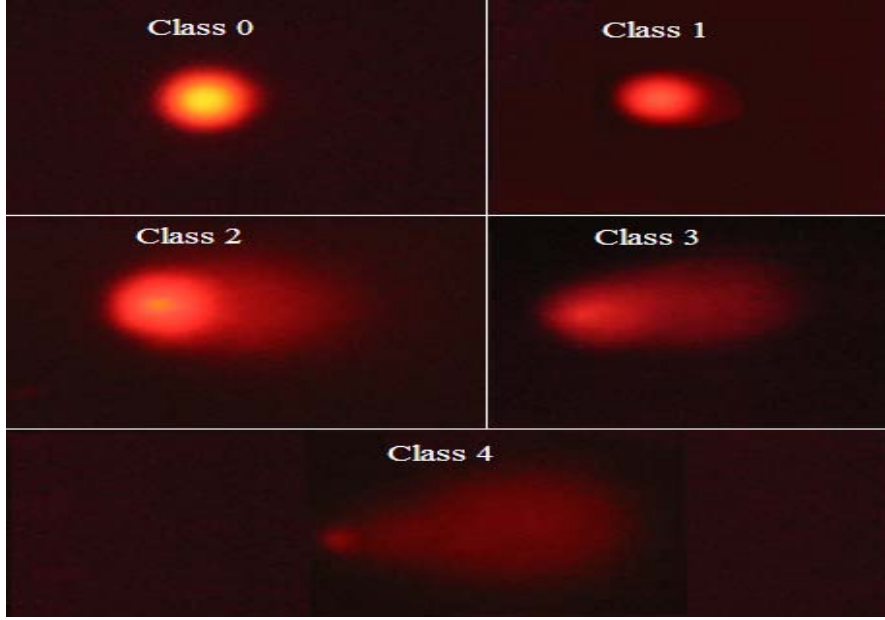
Nötralizasyon tamamlandıktan sonra boyama yapılarak cometler sayılır veya jel oda sıcaklığında kurutularak slaytlar nemli ortamda en fazla bir hafta depolanabilir. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütmeli floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.



Şekil 3.1. Etidyum Bromid ile Boyanmış DNA ların floresan mikroskop görüntüsü

Bu yöntemde DNA hasarı Floresan Mikroskopta (Olympus) gözle değerlendirildi. DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0 maksimum hasar olan DNA lar 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 (20-24).



Şekil 3.2. Meydana gelen DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altındaki görüntüleri

3.2.7. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS veya TAK)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur.

3.2.7.1. Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözdürülerek hazırlanır.

240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

3.2.7.2. Prensip

Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (114).

3.2.8. Total Oksidan Seviye (TOS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

3.2.8.1.Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H_2SO_4 çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM ksilenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözümlenerek hazırlanır.

560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

3.2.8.2. Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon 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 (115).

3.2.9. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar kontrollerin oluşturduğu DNA hasar durumu grafiği çizilerek analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mononükleer Lökosit Sayım Bulguları

Araştırmamızda sağlıklı bireyden alınan venöz kan separe edilmek üzere heparinli tüp içerisine alındı. Heparinize edilmiş kandan histopaque-1077 yardımıyla mononükleer lökositler separe edilerek 20 ml'lik kültür ortamına alındı. Günde iki ekstraktın farklı konsantrasyonlarında çalışmalar yapıldı. Thoma lamı sayımında, lökosit süspansiyonlarının her mililitresi başına $1,2-1,5 \times 10^6$ lökosit sayımı yapıldı.

4.2. Mononükleer Lökosit DNA Hasarı bulguları

Deneylerimizde hidrojen peroksitin genotoksik hasarının oluşmasını önlemek için iki farklı yol kullanıldı. Bunların ilkinde ekstraktlar oluşturulmuş genotoksik hasarı tedavi amaçlı olarak verilirken, diğer yöntemde genotoksik hasarın oluşumunu önleme amacıyla verildi. Genotoksik hasarın tedavi amaçlı yapılan tüm deneylerinde her iki ekstraktın tüm konsantrasyonlarında DNA hasarı pozitif kontrole yakın ve hatta daha yüksek bulundu.

Genotoksik hasarın oluşumunu önleme amaçlı yapılan her iki ekstraktın tüm farklı konsantrasyonlarının deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün çok altında ve negatif kontrole daha yakın bulundu. Ayrıca ticari yağların genotoksik hasarın korunmasında diğer

ekstraktlara göre daha az etkili olduğu bulundu. Deneylelerimizde KES ve EKS ekstraktlarının genotoksik hasara karşı en iyi koruyucu oldukları bulundu.

EKS ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 6,25 (1/80 dilüsyon) – 12,5 (1/40 dilüsyon) mg/dl konsantrasyonlarında idi. 12,5 mg/dl’lik EKS ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 6,25 mg/dl’nin altındaki konsantrasyonlarında hidrojen peroksite karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.).

KES ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında, genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde, DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 3,12 (1/160 dilüsyon) – 6,25 (1/80 dilüsyon) mg/dl konsantrasyonlarında idi. 6,25 mg/dl’lik KES ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 3,12 mg/dl’nin altındaki konsantrasyonlarında hidrojen peroksite karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

THS ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 2,5 (1/40 dilüsyon) mg/dl konsantrasyonunda idi. 2,5 mg/dl’lik THS ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 2,5 mg/dl’nin altındaki THS ekstrakt konsantrasyonlarında hidrojen peroksite karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. : Farklı Dilüsyonlardaki Sarımsak ve Çörekotu Ekstraktlarının H₂O₂ nin oluşturduğu DNA Hasarına (AU) Karşı Direnci

	POZK	EKS	KES	THS	KTS	EKÇO	KÇO
1/10	80	60	22	37	15	40	38
1/20	81	50	14	29	15	20	38
1/40	79	8	7	10	18	30	25
1/80	80	4	3	21	24	28	31
1/160	80	20	2	35	32	11	39
1/320	79	24	16	41	35	12	53
1/640	83	28	24	48	42	44	58
1/1280	81	54	28	54	44	49	66

POZK: Pozitif Kontrol,

EKS: Ezilip kaynatılarak elde edilen sarımsak ekstraktı,

KES: Kaynatılıp ezilerek elde edilen sarımsak ekstraktı,

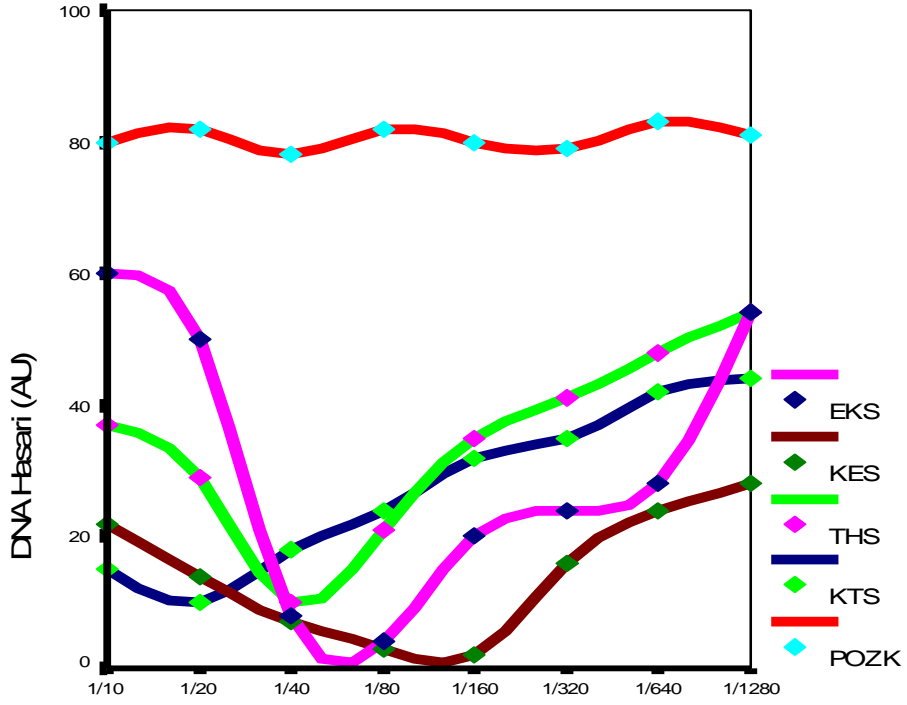
THS: Toz halde elde edilen sarımsak ekstraktı,

KTS: Kaynatılıp toz haline getirilerek elde edilen sarımsak ekstraktı,

EKÇO: Ezilip kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi

KÇO: Ezilmeden kaynatılmış çörek otu ekstraktı elde edilmesi

KTS ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 5 mg/dl (1/20 dilüsyon) konsantrasyonunda idi. 5 mg/dl’lik KTS ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 5 mg/dl’nin altındaki KTS ekstrakt konsantrasyonlarında H₂O₂ karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

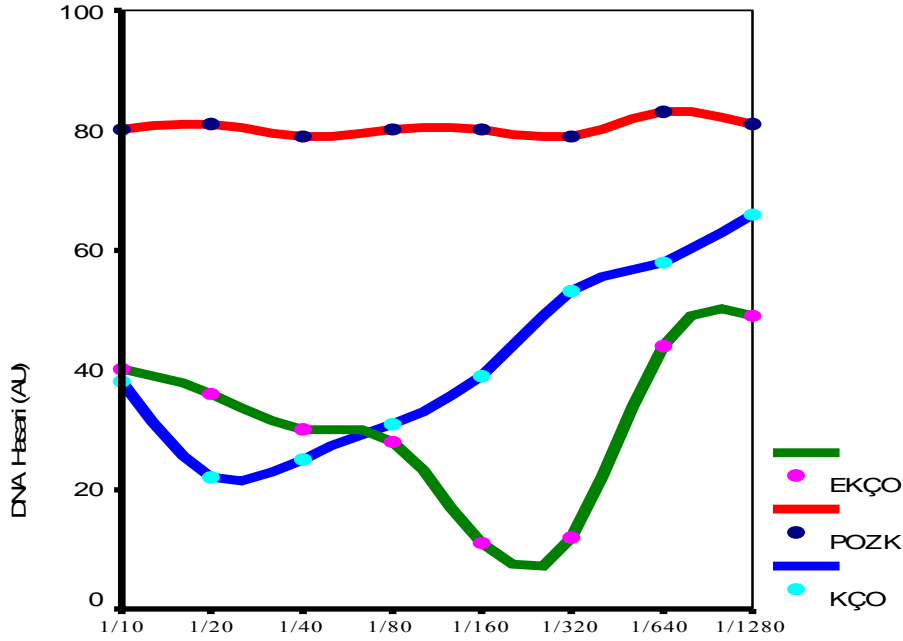


Şekil 4.1. Farklı Dilüsyonda EKS, KES, THS, KTS Ekstraktları ve Pozitif Kontrol DNA Hasarı (AU)

EKÇÖ ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 1,56 (1/320 dilüsyon) – 3,12 (1/160 dilüsyon) mg/dl konsantrasyonlarında idi. 3,12 mg/dl’lik KES ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 1,56 mg/dl’nin altındaki konsantrasyonlarında hidrojen peroksit karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).

KÇÖ ekstraktının tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 25 (1/20 dilüsyon) mg/dl konsantrasyonunda idi. 25 mg/dl’lik KÇÖ ekstrakt konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 25 mg/dl’nin altındaki

konsantrasyonlarında hidrojen peroksit'e karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. EKÇÖ, KÇÖ Ekstraktlarının Farklı Dilüsyonları ve Pozitif Kontrol DNA Hasarı (AU)

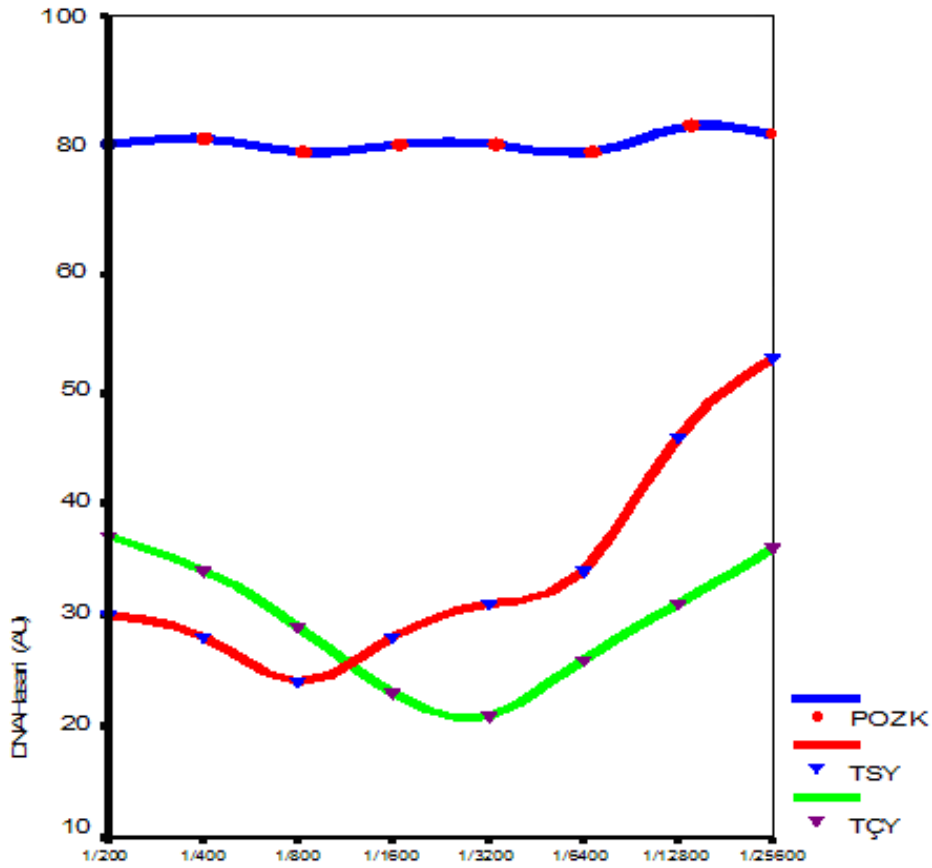
TSY'nin tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 1.25 (1/800 dilüsyon) μl /dl konsantrasyonunda idi. 1.25 μl /dl'lik TSY konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken, 1.25 μl /dl'nin altındaki TSY konsantrasyonlarında hidrojen peroksit'e karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

TÇY'nin tüm farklı konsantrasyonlarında genotoksik hasarın oluşumunu önleme deneylerinde DNA hasarı pozitif kontrolün altında idi ve en iyi ekstrakt konsantrasyonu 0.31 (1/3200 dilüsyon) μl /dl konsantrasyonunda idi ve 0.31 μl /dl'lik TÇY konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda genetik hasarın korunmasında azalma olduğu ve çok yüksek

konsantrasyonlarda hasarın arttığı görülürken 0.31 µl /dl'nin altındaki TÇY konsantrasyonlarında hidrojen peroksite karşı genetik hasarın korunmasının yetersiz olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

Tablo 4.2. : TSY, TÇY Ekstraktlarının Farklı dilüsyonlarında Mononükleer Lokosit DNA Hasarı (AU)

	POZK	TSY	TÇY
1/200	80	38	37
1/400	81	22	34
1/800	79	25	29
1/1600	80	31	23
1/3200	80	39	21
1/6400	79	53	26
1/12800	83	58	31
1/25600	81	66	36



Şekil 4.3. TSY, TÇY Ekstraktlarının Farklı dilüsyonlarında DNA Hasarı (AU)

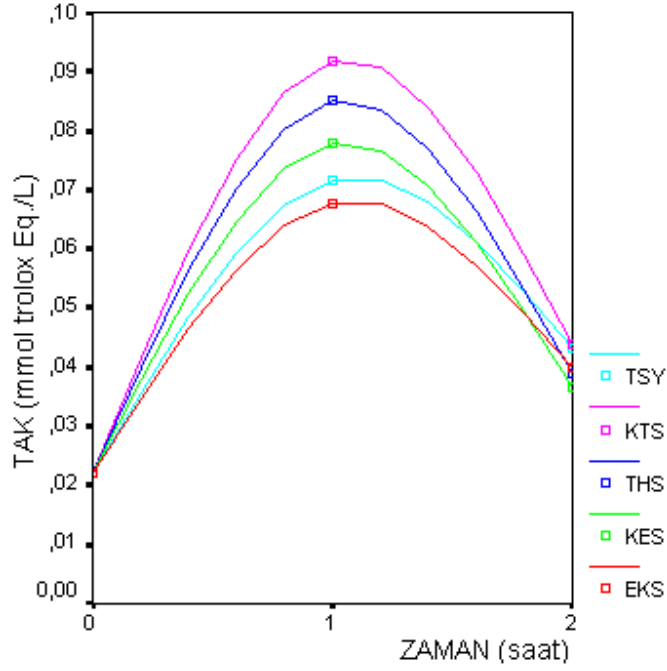
Kültür ortamında mononükleer lokositlerde H₂O₂ ile DNA hasarı oluşturulduktan sonra farklı dilüsyonlarda sarımsak ve çörek otu ekstraktları ortama ilave edilip bir saat inkübasyondan sonra hasar durumu değerlendirildiğinde hiçbir ekstrakt ile oluşan DNA hasarında bir azalma veya artmanın tespit edilemediği görüldü.

Ekstraktların minimum DNA hasarı oluşturan dilüsyonlarındaki flaklardan alınan numunelerden yapılan TAK ve TOS seviyelerinin ölçümünden elde edilen sonuçlara göre ; ortamda yalnızca hücrelerin bulunduğu, ekstraktların bulunmadığı numunede TAK'in de en düşük seviyede olduğu, ortama sarımsak ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TAK seviyesinin en yüksek olduğu ekstraktın KTS olduğu, en az artış gösteren ekstraktın ise EKS olduğu görüldü. Ortamlara H₂O₂ eklendiğinde ise TAK seviyelerinin hızla düşüşe geçtiği tespit edilmiştir. (Şekil 4.4).

Tablo 4.3. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

	EKS	KES	THS	KTS	TSY
0	0,0220	0,0220	0,0220	0,0220	0,0220
1	0,0678	0,0778	0,0850	0,0918	0,0717
2	0,0399	0,0365	0,0388	0,0440	0,0433

0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor



0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor

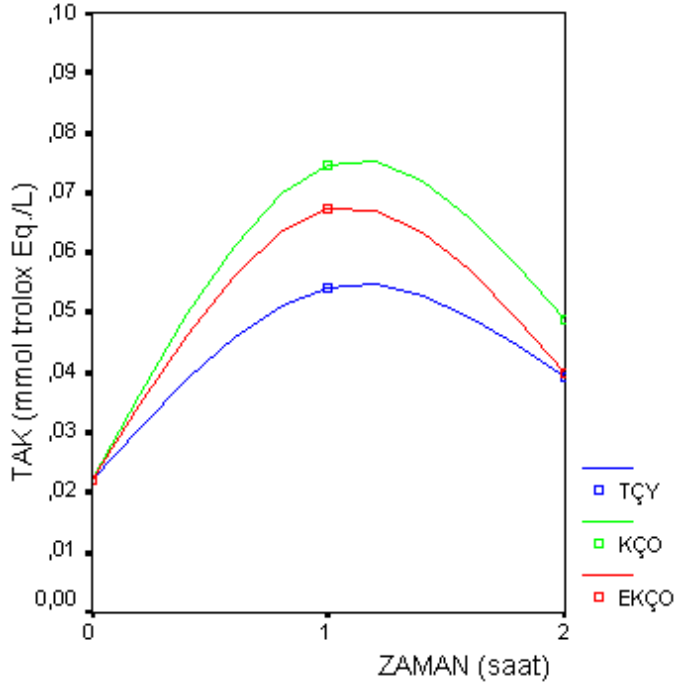
Şekil 4.4. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

Minimum DNA hasarı dozunda yapılan çalışmada TAK, ortamda yalnızca hücreler olduğunda en düşük seviyesini almıştır. Ortama çörek otu ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TAK'ı en fazla artış gösteren KÇO olmuştur. En az artış gösteren ise TÇY olmuştur. Ortama H₂O₂ eklendiğinde ise TAK düşüş eğilimine geçmiştir (Şekil 4.5).

Tablo 4.4. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

	EKÇO	KÇO	TÇY
0	0,0220	0,0220	0,0220
1	0,0674	0,0747	0,0542
2	0,0398	0,0489	0,0394

0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor



0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor

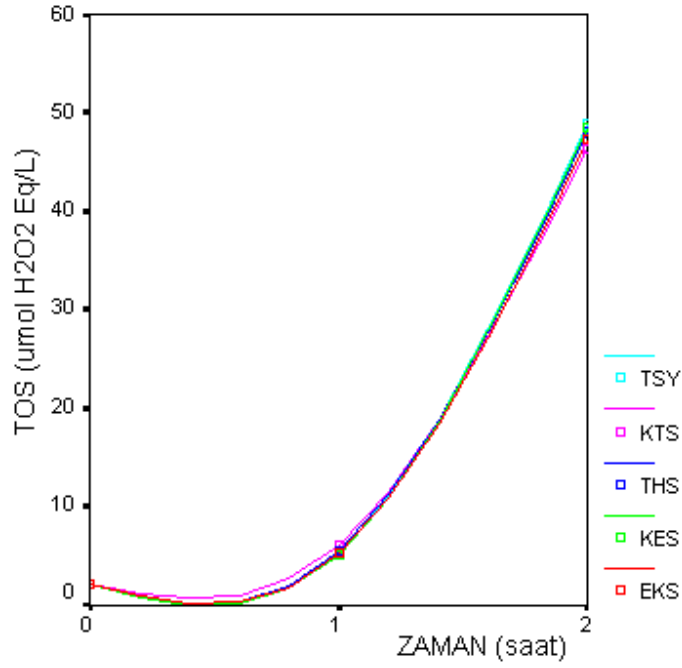
Şekil 4.5. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

Minimum DNA hasarının olduğu dilüsyonda ölçülen TOS seviyeleri çok düşük iken, ortama sarımsak ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TOS biraz artış eğilimi göstermiştir. Ortama H₂O₂ eklendiğinde ise TOS maksimum değerine çıkmıştır (Şekil 4.6).

Tablo 4.5. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TOS (µmol H₂O₂ equivalent/L) ile ilişkisi.

	EKS	KES	THS	KTS	TSY
0	2,1900	2,1900	2,1900	2,1900	2,1900
1	5,2700	5,2000	5,5200	6,1000	5,2400
2	47,240	48,560	48,090	46,4200	49,000

0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor



0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H₂O₂ içeriyor

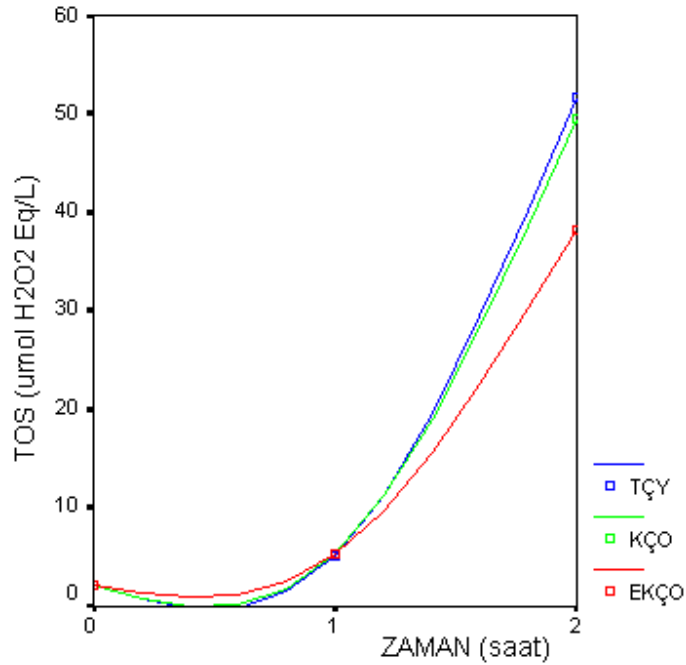
Şekil 4.6. Minimum DNA hasarı dozunda sarımsak ekstraktlarının işlem süresince TOS (µmol H₂O₂ equivalent/L) ile ilişkisi.

Minimum DNA hasarı dozunda yapılan çalışmada TOS, ortamda yalnızca hücreler olduğunda en düşük seviyesini almıştır. Ortama çörek otu ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TOS biraz artış eğilimi göstermiştir. Ortama H₂O₂ eklendiğinde ise TOS maksimum değerine çıkmıştır (Şekil 4.7).

Tablo 4.6. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) ile ilişkisi.

	EKÇÖ	KÇÖ	TÇY
0	2,1900	2,1900	2,1900
1	5,3500	5,2500	5,2200
2	49,4100	38,2700	51,6300

0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H_2O_2 içeriyor



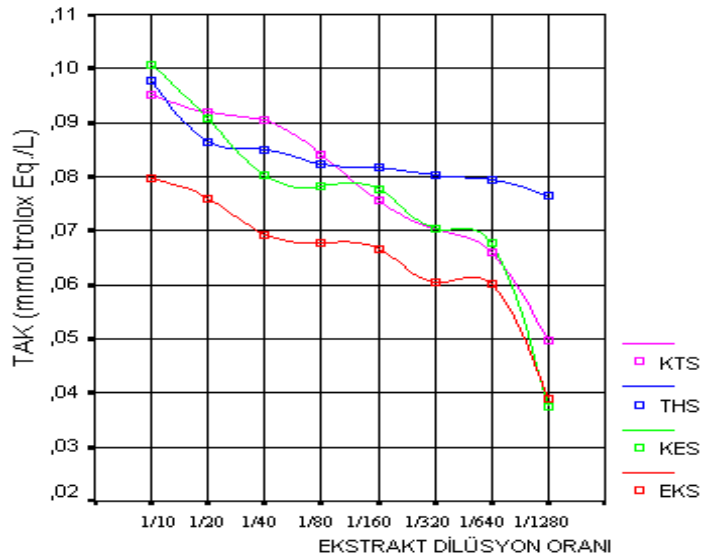
0.Ortamda yalnızca hücreler var 1. Ortam ekstrakt içeriyor 2. Ortam H_2O_2 içeriyor

Şekil 4.7. Minimum DNA hasarı dozunda çörek otu ekstraktlarının işlem süresince TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) ile ilişkisi.

Ortamda yalnızca sarmısak ekstraktları varken 1/10 dilüsyonda TAK'lar karşılaştırıldığında KES'in değeri maksimum olmuştur. EKS'nin değeri ise minimum olmuştur. Ekstrakt dilüsyon oranı azaldıkça TAK düşmüştür. En fazla düşüş KES'de olmuştur. En az düşüş ise THS'de olmuştur (Şekil 4.8).

Tablo 4.7. Ortamda yalnızca sarımsak ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

	EKS	KES	THS	KTS
1/200	0,0445	0,0366	1/200	0,0016
1/400	0,0436	0,0398	1/400	0,0384
1/800	0,0398	0,0347	1/800	0,0398
1/1600	0,0413	0,0359	1/1600	0,0475
1/3200	0,004	0,0206	1/3200	0,0341
1/6400	0,0399	0,0365	1/6400	0,0331
1/12800	0,0379	0,0366	1/12800	0,044
1/25600	0,0387	0,0402	1/25600	0,0419

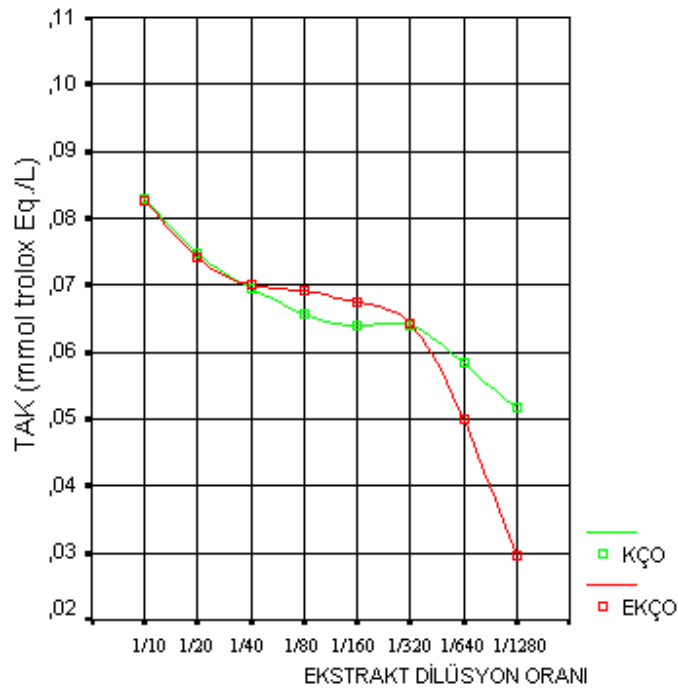


Şekil 4.8. Ortamda yalnızca sarımsak ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

Ortamda yalnızca çörek otu ekstraktları varken 1/10 dilüsyonda TAK'lar karşılaştırıldığında KÇO ve EKÇO değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ekstrakt dilüsyon oranı azaldıkça TAK düşmüştür. En fazla düşüş EKÇO'da olmuştur. En az düşüş ise KÇO'da olmuştur (Şekil 4.9).

Tablo 4.8. Ortamda yalnızca çörek otu ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK ile (mmol Trolox equivalent/L) ilişkisi.

	EKÇO	KÇO
1/200	0,0243	0,0259
1/400	0,0387	0,0399
1/800	0,0421	0,0371
1/1600	0,028	0,043
1/3200	0,0237	0,0387
1/6400	0,04	0,0489
1/12800	0,0321	0,058
1/25600	0,0515	0,044

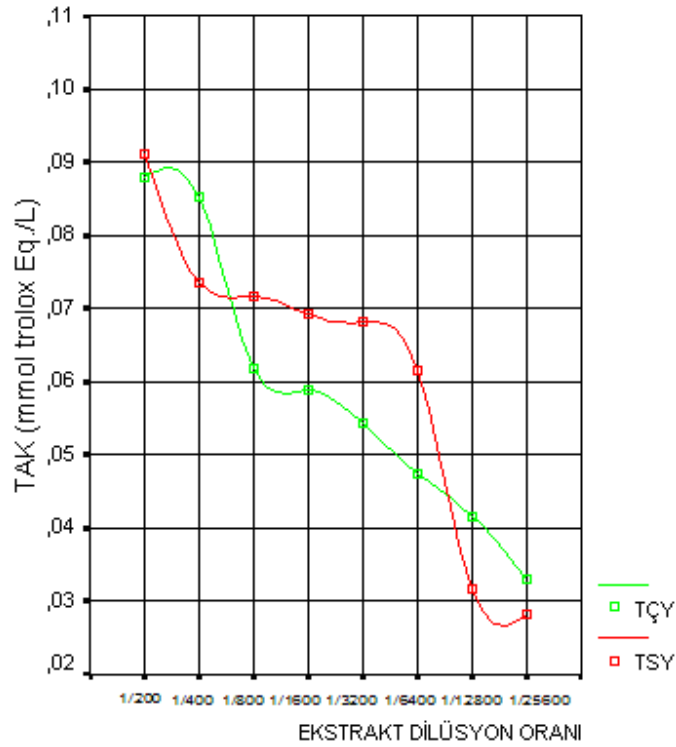


Şekil 4.9. Ortamda yalnızca çörek otu ekstraktları varken ekstraktların farklı konsantrasyonlarında TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişki.

Ortamda yalnızca ticari sarımsak yağı ve ticari çörek otu yağı varken 1/10 dilüsyonda TAK'lar karşılaştırıldığında TSY ve TÇY değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ekstrakt dilüsyon oranı azaldıkça TAK düşmüştür. En fazla düşüş TSY'de olmuştur. En az düşüş ise TÇY'de olmuştur (Şekil 4.10).

Tablo 4.9. Ortamda yalnızca Ticari Yağ varken yağların farklı konsantrasyonlarında TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişki.

	TSY	TÇY
1/200	0,0433	0,0318
1/400	0,0395	0,0371
1/800	0,0463	0,0429
1/1600	0,0455	0,0394
1/3200	0,0425	0,0336
1/6400	0,0386	0,0419
1/12800	0,0364	0,0418
1/25600	0,0374	0,0402



Şekil 4.10. Ortamda yalnızca Ticari Yağ varken yağların farklı konsantrasyonlarında TAK (mmol Trolox equivalent/L) ile ilişkisi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada farklı yöntemlerle elde edilen sarımsak ve çörekotu ekstraktlarının kültür ortamında mononükleer lökosit hücrelerde H₂O₂'nin oluşturduğu DNA hasarını önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla dört farklı sarımsak ve iki farklı çörekotu ekstraktlarının sekiz farklı dilüsyonlarının yanı sıra ticari olarak satılan sarımsak ve çörek otu yağlarının farklı dilüsyonları kullanılmıştır. Güçlü mutagen özelliği nedeni ile pozitif kontrol olarak H₂O₂ ve negatif kontrol olarak da sadece DMEM besiyeri kullanılmıştır.

DNA hasar seviyesi hassas ve ucuz bir yöntem olan alkalın tek hücre elektroforez yöntemi (Comet Assay) ile, oksidatif durum Erel yöntemi olan TAK ve TOS ölçüm metodu ile tayin edilmiştir.

Koruyucu etkinlikte kültür ortamındaki mononükleer lökositlere önce ekstraktlar veya ticari yağlar farklı dilüsyonlarda uygulanmış ve ardından hemen H₂O₂ eklenmiş, neticede H₂O₂'in DNA hasarlayıcı etkisine karşı ekstraktların belirli dozlarda maksimum bir savunma hattı oluşturarak DNA hasarını önemli fakat farklı derecelerde azalttığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte kültür ortamında bulunan lökositler önce H₂O₂ ile hasara uğratılıp daha sonra aynı ekstraktlar ile muamele edildiğinde oluşan hasarın tamir edilmediği görülmüştür. Ayrıca, kültür ortamına ilave edilen ekstraktlarda TAK ve TOS seviyeleri tayin edilerek DNA hasarı ile oksidatif durum arasındaki ilişki araştırılmış, ekstraktların TAK seviyelerinin dilüsyon artışı ile birlikte azaldığı DNA hasarına direncin en yüksek olduğu ekstraktlarda

antioksidan seviyesinde en yüksek düzeyde olduğu ancak H₂O₂ ilavesi ile birlikte antioksidan kapasitenin hızla düştüğü tespit edilmiştir. Yapılan çalışma toplumda fitoterapide yaygın olarak kullanılan sarımsak ve çörekotunun DNA hasarı oluşumunu önlemede etkinliğini ve bu etkinlik ile ekstraktların antioksidatif kapasiteleri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır.

Son yıllarda, insanların yaklaşık 5000 yıldır gıda maddesi olarak kullandığı sarımsağın (*Allium sativum*) ve çörekotunun, bakterisidal, hipoglisemik, antitrombotik, antiaterosklerotik, antimutagenik ve antikanserogenik etkileri ile ilgili pek çok çalışmanın yapılmakta olduğu ve pek çok hastalığın tedavisinde fitoterapotik ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir (116, 117). Biz çalışmamızda, insan mononükleer lökosit hücreleri ile oluşturulan kültür ortamında bu iki bitkinin farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktlarının farklı dilüsyonlarının bir taraftan DNA hasarı oluşumuna karşı dirençlerini, dolayısı ile kanser oluşumunu önlemedeki etkilerini araştırırken, diğer taraftan oluşturulan DNA hasarını tamir edip edemediklerini ve bu etkiler ile ekstrakt uygulanan ortamın oksidatif durumu arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Yaptığımız çalışmada, hücre kültür ortamında mononükleer lökosit hücre DNA'larının H₂O₂'nin genotoksik etkilerine karşı en iyi koruyucu etkinliğin EKS ve KES ekstraktlarında olduğu, bu ekstraktlardan en iyi DNA hasarına karşı en etkili direncin EKS için 1/80 lik dilüsyonun (6.25 mg/dl), KES için ise 1/160 lık dilüsyonun optimum konsantrasyon olduğu, KES ile karşılaştırıldığında EKS ekstraktı daha yüksek konsantrasyonlarda etkin koruma sağlayabildiği ve negatif kontrol ile neredeyse aynı DNA hasarı cevabını verdiği görülmüştür. Bu iki formun diğer formlardan ayrılan en önemli özelliği, bitkinin sadece ezilme ve kaynatma işlemlerine tabi tutulmasıdır. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş sarımsak ekstraktlarında ise DNA hasarına karşı direncin daha düşük seviyelerde kaldığı tespit edilmiştir. Bulgular, sarımsağın DNA hasarına karşı etkili bir şekilde direnç oluşturduğunu ancak, bu etkinin oluşabilmesi için optimum bir doza ve ekstraksiyon yöntemine gereksinim duyulduğunu, optimum dozun altında ve üstündeki

konsantrasyonlarda DNA hasarına karşı direncin düştüğünü, kurutma toz haline getirmekle elde edilen sarımsak ekstraktların taze kaynatılarak elde edilen ekstraktlara göre DNA hasarını önleyici bir kısım özelliklerini kaybetmiş olabileceğini göstermektedir.

Çörek otu ekstraktları olan EKÇO ekstraktının en iyi etkin koruyuculuk dozları 1/320 dilüsyon (1,56 mg/dl) ve 1/160 dilüsyon (3,12 mg/dl) konsantrasyonlarında iken KÇO ekstraktında 1/20 dilüsyon (25 mg/dl) konsantrasyonundadır. Çörek otu ekstraktları karşılaştırıldığında KÇO yöntemine göre, EKÇO yönteminde daha düşük dozlarda koruyucu etkinliğin eşit derecede olması ekstraktın hazırlanma biçimiyle ilişkili olabilir. EKÇO ekstraktında kaynatma işleminden önce ezme işlemi yapılmış iken KÇO ekstraktında ezme işlemi yapılmamıştır. Buradan ezme işlemi ile birlikte çörek otu yapısındaki moleküllerin kaynatma işlemi sırasında daha fazla miktarda ekstraksiyon sıvısına geçmiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sarımsak ekstraktlarından EKS ve KES ekstraktlarının çörek otu ekstraktları olan EKÇO ve KÇO ile aynı yöntemlerle (kaynatma ve ezme) elde edilmiş olmalarına rağmen sarımsak ekstraktlarındaki koruyucu etkinlik çörek otu ekstraktlarına nazaran daha yüksek bulunmuş olması, sarımsağın koruyucu etkinliğinin çörek otuna göre daha fazla olduğunu göstermiştir.

Ticari yağ formlarından olan TSY formunun en iyi etkin koruyucu dozu 1,25 (1/800 dilüsyon) µl /dl iken TÇY formunun 0,31 (1/3200 dilüsyon) µl /dl bulunmuştur. Her iki formda da koruyucu etkinlikler birbirine yakın bulunmuş ve yaklaşık hidrojen peroksidin oksidan etkisini dörtte bir oranına düşürmüşlerdir. Ancak diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre koruyucu etkinlikleri yeterli olmamıştır. Sonuçlar ticari olarak satılan sarımsak ve çörekotu yağlarının elde edilişi sırasında bu bitkilerin DNA hasarını önleyen bir kısım özelliklerinin kaybolduğunu, bizim kullandığımız ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların ticari olarak satılan yağlara göre daha etkin olduğunu göstermiştir.

Kültür ortamında mononükleer lokositlerde H₂O₂ ile DNA hasarı oluşturulduktan sonra farklı dilüsyonlarda sarımsak ve çörek otu ekstraktları ortama ilave edilip bir saat inkübasyondan sonra hasar durumu değerlendirildiğinde hiçbir ekstrakt ile oluşan DNA hasarında bir azalmanın tespit edilememesi, çörekotu ve sarımsağın daha çok DNA hasarı ve kanser oluşumunu önlemede proflaktik olarak etkili olabileceğini (118, 119), dolayısı ile özellikle sağlıklı kişilerin kansere yakalanmamak için tüketmeleri gereken bir besin olduğunu, DNA'sı hasarlanan veya kanser olan bir kişinin DNA'sını tamir etmede fazla etkinliğinin olmayabileceğini göstermiştir.

Ekstraktların minimum DNA hasarı oluşturan dilüsyonlarındaki flaklardan alınan numunelerden yapılan TAK ve TOS seviyelerinin ölçümünden elde edilen sonuçlara göre; ortamda yalnızca hücrelerin bulunduğu, ekstraktların bulunmadığı numunede TAK'ın da en düşük seviyede olması, ortama sarımsak ekstraktları eklendiğinde ise 1. saatin sonunda TAK seviyesinin en yüksek seviyeye çıkması ve ortama H₂O₂ eklendiğinde ise TAK seviyelerinin hızla düşüşe geçmesi DNA hasarını önlemede sarımsak ve çörekotunda bulunan antioksidan içerikli bileşiklerin önemli rollerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Minimum DNA hasarının olduğu dilüsyonda ölçülen TOS seviyeleri çok düşük iken, ortama sarımsak ve çörekotu ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TOS biraz artış eğilimi göstermesi ve ortama H₂O₂ eklendiğinde ise TOS maksimum değere çıkması sarımsak içerisinde de az da olsa oksidan içerikli meddelerin bulunabileceğini göstermiştir.

Çörek otu ve sarımsak ekstraktlarının ezilmiş ve kaynatılmış formlarının DNA hasarına karşı direnç oluşturma etkinlikleri arasında da istatistiki bakımdan anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Biz bu çalışmayla çörek otunun ve sarımsağın sitotoksik bir ajan olan H₂O₂'nin DNA'da hasar oluşturuu etkisine karşı önemli derecede koruyucu özelliğe sahip olduğunu ancak hasarlanan hücreleri tamir etmede yetersiz kaldıklarını tespit ettik. Dolayısı ile bu bitkilerin, DNA hasarının neden olduğu hastalıklar oluştuktan sonra değil de, oluşmadan önce koruyucu olarak ve optimum dozda alımının sağlanması gerektiğini, gösterdik. Çalışmamız in vitro hücre kültürü ortamında yapılan bir çalışmadır. In vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Couladis,M., O.Tzakou., E.Verykokidou., C. Harvala. 2003. Screening Of Some Grek Aromatic Plants For Antioxidant Activity. *Phytotherapy Research*. 17: 194-195.
2. Capecka, E., A.Mareczek., M.Leja., 2004. Antioxidant Activity Of Fresh And Dry Herbs Of Some Lamiaceae Species. *Food Chemistry*. 93: 223-226.
3. Chung,K.T., Lu,Z., Chou,M.W. 1998. Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 36:1053-160.
4. Bhattacharya, A., M. Kumarm., S. Ghosal., S.K. Bhattacharya. 2000. Effect of Bioactive Tannoid Principler of *Emblica officinalis* on Iron-induced Hepatic Toxicity in Rats. *Phytomedicine*. 7: 173-175.
5. Galı-Muhtasib, H.U.,Younes,I.H., Karchesy, J.J., El-Sabban, M.E. 2001. Plant Tannins Inhibit the Induction of Aberrant Crypt Foci and Colonic Tumors by 1,2-dimethylhydrazine in Mice. *Nutrition Cancer*. 39: 108-116.
6. Nagakawa,T., T.Yokozawa. 2002. Direct Scavenging of Nitric Oxide and Superoxide by Gren Tea. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1745-1750.
7. Cai,Y., Q.Luo., M. Sun., H. Corke. 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sciences*. 74: 2157-2184.

8. Panovska,T.K., Kulevanova,S., Stefova,M., 2005. In vitro Activity of Some Teucrium Species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 55, 207-214.
9. Pillia G. R., 2004. Induction of Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Curcumin. *Cancer Letters.* 208: 163-170.
10. Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953). "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature* 171: 737–738. doi:10.1038/171737a0. PMID 13054692.
11. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 Nobelprize .org Accessed 22 Dec 06.
12. Watson J, Crick F (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid". *Nature* 171 (4356): 737–8.
13. Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6.
14. Venter J, et al. (2001). "The sequence of the human genome". *Science* 297: 1304–51.
15. Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation". *Biochemistry* 42 (30): 9221–6.
16. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage". *Mutat Res* 424 (1–2): 9–21.
17. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B (1989). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (24): 9697–701.

18. Cathcart R, Schwiers E, Saul R, Ames B (1984). "Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (18): 5633–7.
19. Valerie K, Povirk L (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair". *Oncogene* 22 (37): 5792–812.
20. Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H, Retel J. *Mutat. Res.* 1994; 309: 45–52.
21. 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.
22. Halliwell B, Dizdaroglu M. Free radicals and the oxidant/antioxidant balance *J. Free Radical Res.* 1992; 16: 75–87.
23. Horwood E, Epe B. *DNA and Free Radicals*. Chichester 1993; 41-65.
24. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *J. Mutat. Res.* 1992; 275(35): 331–342.
25. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK. *J. Cancer Res.* 1994; 54(6): 12–15.
26. Aruoma OI, Halliwell B. *DNA and Free Radicals: Techniques Mechanisms and Applications*. OICA International 1998; 3–26.
27. Totter JR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77: 1763–7.
28. What is DNA repair?, <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>.

29. Chu G., Biochemistry 201: DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>.
30. DNA Damage, http://saturn.roswellpark.org/cmb/huberman/DNA_Repair/damage_types.html.
31. Beranek DT., Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res.* 1990 Jul;231(1):11-30, Review.
32. Meister A. Glutathione Ascorbate and cellcycle regulation *FEBBS letters* 1994 1,4.
33. Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *J. Annals. int. Med.* 1987;107(6): 526 – 45.
34. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988; 63 (3): 381 – 8.
35. Tappel AL, Dillard JC. *invivo* lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings* 1981; 40(3):174– 8.
36. Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology.* 1993; 49(4): 481– 93.
37. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.* 1995; 42(6):18–19.
38. Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants on antioxidant induced sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. invest.* 1985; 75(3):35 – 7.
39. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984; 222: 1–15.

40. Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J. Pharmacol Review* 1991; 43(29): 109–37.
41. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.* 1995; 42(6):18–19.
42. Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
43. Canbas A. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78, Ç. Ü. Adana. 1983.
44. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J. Toxicology.* 1992; 64 (65): 547–51.
45. Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology.* 1993; 49(4): 481– 93.
46. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. *J. Aging and disease.* 1984; 65(24): 53–66.
47. Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J. Clin. Med.* 1994; 125(35): 26–37.
48. Logani MK, Davies RE. Lipid Oxidation: Biologic effects and antioxidants *J. Lipids.* 1985; 15(5): 6-12.
49. Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirjibels JMF, Monnens LA. Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart. *J. M. Quadri ceps. Lipids.* 1992; 24(7):11–16.
50. Arıcıoğlu A. Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. 1994; 2(3): 139–242.

51. Seven A, _nci F, Civelek S, Burçak G, _nci E, Korkut N. Larenks Kanserli Olgularda Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokuda İncelenmesi. Türk ORL Arşivi 1998; 36: 33–6.
52. Cros CE, Halliwell B, Borish ET. O₂gen radicals and human disease. J. Annals. int. Med. 1987;107(6): 526 – 45.
53. Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Txic Hapatic Injury I. Free Radical Chemistry. J. Clinical Toxicology. 1993; 49(4): 481– 93.
54. Dizdaroglu M. Mechansms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement. Kluwer Academic/Plenum Publihers. 1999; 302: 67–87.
55. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. J. Nutr. 1989; 119(6): 109-11.
56. Anderson ME, Meister A. Glutathione moesters. J. Anal. Biochem. 1989;183: 16-20.
57. Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. J. Med Lab Sci. 1984; 41(3):157-62.
58. Berger SJ, Gosky D, Zberowska E. Sensitive enzymatic cycling in diabetes. J. Diabetes 1991; 46(4): 405 – 12.
59. Burton G, Traber M. Vitamin E : antioxidant activity biokinetics and bioavailability. J. Annu. Rev. Nutr. 1990; J. 10: 357–82.
60. Pabo'n A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. J. Clinical Biochemistry 2003; 36(5): 71–78.

61. Dr. Ahmet Toptaş, Çörekotu Tepeden Tırnağa Şifa Deryası İstanbul, 2008, ISBN 978-9944-62-613-2, Gonca Yayınevi 0212 5285070.
62. Baytop T, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İ.Ü. Yayınları No:3255, (1984), İstanbul.
63. Türker L, Bayrak A (1697). Çörek otu (*Nigella sativa* L)'nun sabit ve uçucu yağ kompozisyonunun araştırılması, Standart, 430, 128-137.
64. Wagner H, Fransworth NR (1990). Economic and Medicinal Plant Research, Vol. 4, Plants and Traditional Medicine, Academic press, London
65. Nergiz C, Ötleş S (1993). Chemical composition of *Nigella sativa* L. Seeds, Food Chem, 48, 3, 259-261.
66. Akhtar MS, Riffat S (1991). Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children, J Pak Med Assoc, 41, 8, 185-187.
67. Salemai ML, Hossainb, MS (2000). Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection, Int J Immunopharmacol, 22, 9, 729-740.
68. Topozada HH, Mazloum HA and El-dakhakhny H (1965). The antibacterial properties of *Nigella sativa* seeds, active principle with some clinical applications, J Egypt Med Ass, Spec Number 48, 187.
69. El-fatatry HM (1975). Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. Seeds, Pharmazie, 30, 2, 109-111.
70. Şener B, Küsmenoğlu S, Mutlugil A, Bingöl F (1985). A study with the seed oil of *Nigella sativa*, Gazi Ecz Fak Der, 2, 1, 1-8.

71. Mohammed Bassim Atta (2003) Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry* 83/ 63-68.
72. Azcan N Kalender BD., Kara M. (2004) 3 farklı Türk çörek otu tohumu çeşidinin yağ asidi bileşikleri ve toplam protein içerikleri ile ilgili araştırma. *Chemistry of naturel compounds* 40(4):370-372.
73. Wagner H, Fransworth NR (1990). *Economic and Medicinal Plant Research, Vol. 4, Plants and Traditional Medicine*, Academic press.
74. El-Kadi A, Kandil O. (1986) Kuwait. Effect of *Nigella sativa* (the black seed) on immunity. *Bull Islamic Med. Proceeding of the 4th International Conference on Islamic Medicine*,; 4: 344-8.
75. *Medical Immunity Medicine* August 1995, September 2000.
76. Erişim: <http://www.kasadsaglik.com/altcorek.htm> (Son erişim tarihi 23.11.2009).
77. Medenica R, Mukerjee S, Huschart T, Koffskey J, Corbit W (1993). *Nigella sativa* plant extract increases number and activity of immune component cell in humans, *Exper Hematol* 21, 3, 1186.
78. *Egypt Tanta University, Nutr Cancer Medicine* February 2003.
79. Mehmet Salih Kaya, Mehmet Kara, Hanefi Özbek (2003); Çörek otu tohumunun insan hücrel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+, hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri *Genel Tıp Derg.*13 (3): 109-112.
80. A.Zaoui, Y.Cherrah, N.Mahassini (2002) Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Phytomedicine* 9: 69-74.
81. El-Naggar ARM, El-Deib AEM. (1992) A study of some biological activities of *Nigella sativa* (black seeds) "Habbat El-Barka" *J Egypt Soc Pharmacol Exp Ther* 11 (2): 781-800.

82. Al-Ghamdi MS. (2001) The antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *JEthnopharmacol.* Jun;76(1):45-48.
83. Mutabagani A, El-Mahdy SAM. (1997) A study of the anti-inflammatory activity of *Nigella sativa* L and thymoquinone in rats. *Saudi Pharm J*, 5 (2): 110-3.
84. Al-Majed AA Daba MH, Asiri YA, (2001) Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 110(5-6):333 345.
85. Al-Ghamdi MS. (2001) The antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *JEthnopharmacol.* Jun;76(1):45-48.
86. Manoj Kumar Mohan Nair, Pradeep Vasudevan,(2005)., Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes* *Food Control* 16 395-398.
87. Ağaoglu S, Berktaş M, Güdücüoğlu H (1999). Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunun antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*,5,1-2,15-17.
88. Topozada HH, Mazloum HA and El-dakhkhny H (1965). The antibacterial properties of *Nigella sativa* seeds, active principle with some clinical applications, *J Egypt Med Ass, Spec Number* 48, 187.
89. El-Fatary (1975) Isolation and structure assignment of an anti-microbial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L seeds *Pharmazie* 30 (2): 109-11.
90. Hanafi MS, Hatem ME (1991) Studies on the anti-microbial activity of the *Nigella sativa* seed (Black Cumin). *J Ethnopharmacol* 34 (2-3): 275-8.
91. Al-Ghamdi MS, (2003) Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage *Am J Chin Med.* 31 (5):721-728.

92. Meral I., Yener Z., Kahraman T., Mert N., (2001) Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally induced diabetic rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 48(10):593-599.
93. Turkdogan MK Özbek H, Yener Z, (2000) The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 17(8):942-946.
94. Fararh K. M Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T.(2002) Isulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in Streptozotocin plus Nicotinamide diabetic hamster *Res Vet Sci.*;73(3):279-282.
95. Talat Güler,Bestami Dalkılıç,O.Nihat Ertaş,(2002) The Effect of Black Cumin Seeds İn Diets On The Performance Of Broilers, *Standart*, 430, 128-137.
96. Denli M., Okan F., luocak AN;(2004). Effect Of Dieatary Black Seed Extract Supplementation On Laying Performance And Egg Quality Of Quail *Journal of applied Animal Research* 26(2): 73-76.
97. Pinto J. T. and R.S. Rivlin 2001. Antiproliferative Effects of *Allium* Derivatives from Garlic. *J.Nutr.*131: 1058S-1060S.
98. Devrim E. 2004. Hücre Kültürü Yöntemleri ve Çeşitli Hücre Serilerinde Sarımsak Bileşenlerinin Etkileri (Seminer). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
99. Kemper, K.J. 2000. <http://www.mcp.edu/herbal/default.ht>.

100. Bianchini F. and H. Vainio. 2001. Allium Vegetables and Organosulfur Compounds: Do They Help Prevent Cancer? *Environmental Health Perspectives*. 109 (9): 893-902.
101. Popov et.al., 1994'e atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
102. Agarwal, 1996 ve Agusti, 1996'a atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
103. Lau, 2001 ve Banejee et.al., 2002'a atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97-106.
104. Popov et.al., 1994'e atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
105. Fanelli et.al.,1998'e atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
106. Maslin et.al.,1997'e atfen Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
107. Banerjee S.K., K.P. Mukherjee., S.K. Maulik. 2003. Garlic as an Antioksidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy Research*. 17: 97106.
108. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HAP, Witteman JCM. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999;159:2170-4.

109. Borochoy-Neori H, Judeinstein S, Greenberg A, Fuhrman B, Attias J, Volkova N, Hayek T, Aviram M. Phenolic Antioxidants and Antiatherogenic Effects of Marula (*Sclerocarya birrea* Subsp. *caffra*) Fruit Juice in Healthy Humans. 2000.
110. Freshney, R. I., (1994) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. John Wiley and Sons, New York.
111. Barker K., (1998) At the Bench: A Laboratory Navigator. Cold Spring Harbor Press, New York.).
112. Sermenli MH, Farklı Yöntemlerle Elde Edilmiş Sarımsak (*Allium sativum* L.) Ekstraktlarının Antimutagenik Etkilerinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biy-Y1-2007-0002.
113. P.N. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.* 175 (1988) 184–191.
114. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112– 9.
115. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
116. Jae-Hee Park & Yoo Kyoung Park & Eunju Park. Antioxidative and Antigenotoxic Effects of Garlic (*Allium sativum* L.) Prepared by Different Processing Methods *Plant Foods Hum Nutr* (2009) 64:244–249.
117. Daoud M., Dilsiz N., Gumushan H., Ulakoglu G., Bitiren M. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds *Biologia*, Bratislava, 59/6: 735—740, 2004.

118. Burits, M. Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res.* 14: 323–328.

119. Sheylesh, B. S. Padikkala, J. 2000. In vitro cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) DC in mice. *J. Ethnopharmacol.* 73: 495–500.