



**DNA'NIN OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE  
FENOLİK MADDELERİN ETKİSİ**

**Önder AYBASTIER**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DNA'NIN OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE  
FENOLİK MADDELERİN ETKİSİ**

**Önder AYBASTIER**

Prof.Dr. Cevdet DEMİR  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2016

## TEZ ONAYI

Önder AYBASTIER tarafından hazırlanan “DNA’NIN OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE FENOLİK MADDELERİN ETKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Cevdet DEMİR

**Başkan :** Prof. Dr. Cevdet DEMİR  
Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı



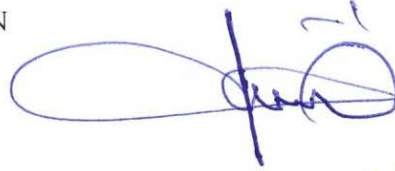
**Üye :** Prof. Dr. Belgin İZGİ  
Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı



**Üye :** Prof. Dr. Hulusi MALYER  
Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı



**Üye :** Prof. Dr. Adnan ÖZCAN  
Anadolu Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı



**Üye :** Doç. Dr. Ömer KOZ  
Bursa Teknik Üniversitesi,  
Doğa Bilimleri, Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR  
Enstitü Müdürü

25/04/2016

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**24/03/2016**

**Önder AYBASTIER**

## ÖZET

Doktora Tezi

DNA'NIN OKSİDATİF HASARI ÜZERİNE FENOLİK MADDELERİN ETKİSİ

**Önder AYBASTIER**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof.Dr. Cevdet DEMİR

DNA'nın oksidatif baz hasarı üzerine karvakrol, timol, timokinon ve kekik bitkisinden elde edilen yağ altı suyu, uçucu yağı ve ekstraktların etkisi incelenmiştir. Öncelikle çalışmada kullanılan kekik türü olan *Origanum vulgare* L.'nin antioksidan özellikleri belirlenmiştir. İncelenen kekik türünün antioksidan kapasitesinin yüksek ve içerdiği temel antioksidan maddelerin karvakrol ve timol olduğu tespit edilmiştir. Sulu çözelti ortamında karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin Fenton reaksiyonu ile oluşturulan hidroksil radikalini süpürme etkisi incelenmiştir. Hidroksil radikalini ( $\bullet\text{OH}$ ) en hızlı timokinonun süpürdüğü belirlenmiştir.

DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile analizi için metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Analiz öncesi türevlendirme koşulları merkezi kompozit dizayn ile optimize edilmiştir. GC-MS/MS çalışma koşulları da optimize edilerek ilk kez 18 farklı DNA oksidatif baz hasar ürünü eş zamanlı ve çok düşük konsantrasyonlarda analiz edilebilmiştir. Buzağı timüs DNA'sı antioksidan içeren ve içermeyen ortamlarda Fenton reaksiyonuna maruz bırakılıp, oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünleri tayin edilmiştir. Antioksidan varlığında, oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünü miktarının azaldığı görülmüştür. Aynı çalışma malign (A549) ve sağlıklı (BEAS-2B) akciğer hücreleri üzerinde de denenmiştir. Hücre kültürü ortamında çalışılan antioksidanlardan ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendikten 48 saat sonra hücreler alınıp, DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'daki oksidatif baz hasar ürünleri analiz edilmiştir. Hücre kültürü ortamında da kullanılan antioksidanların DNA'yı hidroksil radikale ( $\bullet\text{OH}$ ) karşı koruduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında kullanılan antioksidanlardan timokinon DNA'yı oksidasyona karşı korumada daha etkili olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** DNA, oksidatif hasar, antioksidan, karvakrol, timol, timokinon, kekik, GC-MS/MS.

**2016, xiv + 120 sayfa.**

## ABSTRACT

PhD Thesis

### THE EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS ON THE OXIDATIVE DNA DAMAGE

**Önder AYBASTIER**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

**Supervisor:** Prof.Dr. Cevdet DEMİR

The effect of carvacrol, thymol, thymoquinone and essential oil and water extracts from thyme on the oxidative damage of DNA bases was investigated. First of all, the antioxidant properties were determined in the extracts of thyme species of *Origanum vulgare* L. It was found that *Origanum vulgare* L has high antioxidant capacity and its main antioxidant compounds are carvacrol and thymol. The hydroxyl radical scavenging effect formed by Fenton's reaction was investigated for carvacrol, thymol and thymoquinone in aqueous medium. Thymoquinone has the highest hydroxyl radical ( $\bullet\text{OH}$ ) scavenging capability.

The method development studies were carried out for the analysis of DNA oxidative base damage products by GC-MS/MS. The derivatization conditions for DNA oxidation products were optimized before the analysis by central composite design. GC-MS/MS operating conditions were optimized and 18 DNA oxidative base damage products were analyzed simultaneously at low concentrations for the first time. Calf thymus DNA was exposed to Fenton reaction in the presence and absence of antioxidants and DNA oxidative base damage products were analyzed formed during the oxidation reaction. It was demonstrated that the antioxidant compounds have reducing effect on the amount of oxidative DNA base damage products. The same study was also conducted on the malign (A549) and healthy (BEAS-2B) lung cells. The antioxidants of carvacrol, thymol and thymoquinone were incubated for 48 h in cell culture medium with and without the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Then the DNA was isolated from the cell culture and the oxidative base damage products were analyzed by GC-MS/MS. The results show that the antioxidants investigated in this study prevented the DNA oxidation against hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) in cell culture medium. Thymoquinone was the highest antioxidant effect on the protection of DNA oxidation against the hydroxyl radicals.

**Keywords:** DNA, oxidative damage, antioxidant, carvacrol, thymol, thymoquinone, thyme, GC-MS/MS.

**2016, xiv + 120 pages.**

## TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini her zaman yanımda hissettiğim, bana her konuda yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Cevdet DEMİR'e,

Verdiği destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Bu tezi "Bazı Doğal Örneklerden Fenolik Maddelerin İzolasyonu ve Bu Maddelerin DNA Oksidatif Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" projesi OUAP(F)-2013/13 ve "Malign ve Sağlıklı Akciğer Hücrelerinde Oksidatif DNA Hasarı Markör Ürünlerinin Belirlenmesi ve Hasar Oluşumunu Antioksidanların Baskılama Mekanizmalarının Araştırılması" projesi BUAP(F)-2014/5 ile destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

ÇalıŐmalarım sırasında bana yardımcı olan, tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Tez çalıŐmam süresince benden desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, anlayıŐ ve hoŐgörüyle yaklaşan sevgili aileme,

teşekkür ederim.

Önder AYBASTIER  
24/03/2016

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	3
2.1. DNA'nın Yapısı .....	3
2.2. Reaktif Oksijen Türleri .....	7
2.2.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	7
2.2.2. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları.....	9
2.2.2.1. Elektron taşıma zinciri: .....	9
2.2.2.2. Dış etkenler: .....	10
2.2.2.3. Enzimatik tepkimeler: .....	10
2.2.2.4. Enzimatik olmayan tepkimeler: .....	10
2.3. Oksidatif Stres.....	11
2.4. Oksidatif DNA Hasarı ve Nedenleri .....	12
2.4.1. DNA baz hasarı .....	14
2.4.2. DNA şeker hasarı .....	17
2.4.3. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler .....	19
2.4.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları .....	19
2.4.5. 8-hidroksiguanin oluşumu.....	20
2.5. DNA Onarım Mekanizmaları.....	22
2.5.1. Direkt onarım .....	23
2.5.2. Baz kesip çıkarma onarımı (BER) .....	23
2.5.3. Nükleotid kesip çıkarma onarımı (NER) .....	25
2.5.4. Yanlış eşleşme onarımı .....	25
2.5.5. Rekombinasyon/çapraz bağlanma onarımı .....	26



2.6. Kanser Oluşumunda DNA Hasarının Rolü .....	27
2.6.1. Onkogenler .....	27
2.6.2. Tümör baskılayıcı genler.....	27
2.6.3. DNA onarım genleri.....	28
2.6.4. DNA hasarı - kanser İlişkisi.....	28
2.7. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri .....	31
2.8. Akciğer Kanseri .....	35
2.8.1. Akciğer kanseri oluşumu .....	35
2.8.2. Dünya’da ve Türkiye’de akciğer kanseri .....	37
2.9. Antioksidan savunma .....	37
2.9.1. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri .....	38
2.9.2. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri .....	40
2.10. Bitkisel Antioksidan Kaynağı Olarak Kekik.....	41
2.10.1. Türkiye’de kekik .....	42
2.10.2. Kekiğin kullanım alanları.....	43
2.10.3. Kekik yağı ve yağ altı suyu.....	43
2.10.4. Kekiğin kimyasal içeriği .....	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1. Materyal .....	48
3.1.1. Çalışmada kullanılan maddeler .....	48
3.1.1.1. Kimyasallar .....	48
3.1.1.2. Çözeltiler .....	49
3.1.1.3. Kekik .....	51
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	51
3.1.3. Çalışmada kullanılan analitik cihazlar .....	52
3.1.3.1. Gaz kromatografi-kütle spektrometre/kütle spektrometre .....	52
3.1.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi .....	52
3.1.3.3. Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi.....	52
3.2. Yöntem.....	53
3.2.1. Kekik bitkisinden antioksidan maddelerin ekstraksiyonu.....	53
3.2.2. Kekik yağı ve distile suyu eldesi.....	53
3.2.3. Toplam fenolik madde tayini .....	53

3.2.4. Antioksidan kapasite tayini .....	54
3.2.5. Ekstraktların HPLC ile analizi .....	55
3.2.5.1. Fenolik maddelerin tayini .....	55
3.2.5.2. Karvakrol, timol ve timokinon tayini.....	56
3.2.6. Fenton reaksiyonu .....	58
3.2.7. Fenton reaksiyonunun spektrofotometrik ve kromatografik takibi.....	58
3.2.8. DNA oksidatif hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile analizi için metot geliştirme ...	58
3.2.9. DNA oksidatif hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması .....	59
3.2.10. Buzağı timüs DNA'sı ile yapılan çalışmalar.....	60
3.2.11. Malign ve sağlıklı akciğer hücreleri ile yapılan çalışmalar .....	60
3.2.11.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması.....	60
3.2.11.2. Hücre soylarının pasajlanması .....	61
3.2.11.3. Hücrelerin sayımı .....	61
3.2.11.4. SRB (sulforhadamine B) metodu .....	62
3.2.11.5. Örneklerin uygulanması.....	63
3.2.12. Hücrelerden DNA izolasyonu .....	64
3.2.13. DNA miktarı tayini .....	64
3.2.14. DNA numunelerinin GC-MS/MS ile analizi.....	64
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	66
4.1. Kekik ( <i>Origanum vulgare</i> L.) Bitkisinin Antioksidan Özellikleri.....	66
4.1.1. Toplam fenolik madde tayini .....	66
4.1.2. Antioksidan kapasite tayini .....	66
4.1.3. HPLC analizi.....	67
4.2. Fenton Reaksiyonu Çalışmaları .....	68
4.2.1. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme etkisinin spektrofotometrik incelenmesi .....	68
4.2.2. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme etkisinin HPLC ile incelenmesi.....	71
4.2.3. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme kinetiği .....	75
4.3. DNA Oksidatif Baz Hasar Ürünlerinin GC-MS/MS ile Analizi için Metot Geliştirilmesi .....	79

4.3.1. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin analizi için GC-MS/MS çalışma koşullarının belirlenmesi .....	79
4.3.2. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin türevlendirilmesinin kemometrik optimizasyonu .....	83
4.3.3. DNA oksidatif baz hasar ürünleri için validasyon parametreleri .....	90
4.4. Buzağı Timüs DNA'sı ile Yapılan Çalışmalar.....	93
4.5. Malign (A549) ve Sağlıklı (BEAS-2B) Akciğer Hücresi ile Yapılan Çalışmalar ...	96
4.5.1. Hücre kültürü ortamında toksik H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dozunun belirlenmesi.....	96
4.5.2. Hücre kültürü ortamında antioksidanların toksik dozunun belirlenmesi .....	97
4.5.3. Hücre kültürü ortamında oksidan ve antioksidan varlığının malign akciğer hücrelerinde (A549) DNA baz hasar ürünü miktarına etkisi .....	99
4.5.4. Hücre kültürü ortamında oksidan ve antioksidan varlığının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA baz hasar ürünü miktarına etkisi .....	106
5. SONUÇ .....	108
KAYNAKLAR .....	111
ÖZGEÇMİŞ .....	120

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

°C	Santigrat derece
dk	Dakika
eV	Elektronvolt
fmol	Femtomol
g	Gram
h/h	Hacim/hacim
m/z	Kütle/yük
mg/L	Miligram/litre
mM	Milimolar
µg/L	Mikrogram/litre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
ppt	Trilyonda bir kısım
R <sup>2</sup>	Regresyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye

### Kısaltmalar

### Açıklama

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Alx	Alloksan
ANOVA	Varyans analizi
AP	Apürinik/apirimidinik
BSS	Bağıl standart sapma
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid
DAD	Diyot seri dedektör
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECD	Elektrokimyasal dedektör
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
FapyAde	4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometri
GC-MS/MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometri/ kütle spektrometri

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu
LC/MS	Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi
LOD	Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SIM	Seçili iyon izleme
SRM	Seçili reaksiyon izleme
SOD	Süperoksit dismutaz
TG	Timinglikol
TMCS	Trimetilklorosilan
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağlık örgütü
2HA	2-hidroksiadenin
28DHA	2,8-dihidroksiadenin
46D5NP	4,6-diamino-5-nitropirimidin
5FU	5-formilurasil
5HC	5-hidroksisitozin
5HH	5-hidroksihidantoin
5HMC	5-hidroksimetilsitozin
5HMU	5-hidroksimetilurasil
5HU	5-hidroksiurasil
5H5MH	5-hidroksi-5-metilhidantoin
56DHT	5,6-dihidrotimin
56DHU	5,6-dihidrourasil
8HA	8-hidroksiadenin
8HG	8-hidroksiguanin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.1. DNA’da bulunan pürin yapısındaki bazlar.....	3
Şekil 2.1.2. DNA’da bulunan pirimidin yapısındaki bazlar.....	3
Şekil 2.1.3. Guanin ile sitozin ve adenin ile timin arasında oluşan hidrojen bağları.....	4
Şekil 2.1.4. A-DNA, B-DNA ve Z-DNA yapıları.....	5
Şekil 2.1.5. DNA’nın ikili sarmal yapısı.....	6
Şekil 2.3.1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	11
Şekil 2.4.1. DNA’da replikasyon doğruluğunun korunamaması ve olası sonuçları....	13
Şekil 2.4.1.1. DNA’nın oksidatif hasara uğrayabileceği bölgeler.....	14
Şekil 2.4.1.2. DNA bazlarının oksidatif hasar ürünleri.....	17
Şekil 2.4.2.1. Başlıca oksidatif DNA şeker hasar ürünleri.....	18
Şekil 2.4.3.1. Başlıca 8,5’-siklopürin-2’-deoksinükleozidler.....	19
Şekil 2.4.4.1. Başlıca DNA-protein çapraz bağlanmaları.....	20
Şekil 2.4.5.1. 8-hidroksiguanin oluşumu.....	21
Şekil 2.5.2.1. Baz kesip çıkarma onarımı.....	24
Şekil 2.5.3.1. Nükleotid kesip çıkarma onarımı.....	25
Şekil 2.5.4.1. Yanlış eşleşme onarımı.....	26
Şekil 2.6.4.1. DNA hasarı ile kanser oluşumunun şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.7.1. GC/MS ve LC/MS için örnek hazırlama basamakları.....	34
Şekil 2.9.1. Antioksidan savunma mekanizmasının şematik gösterimi.....	38
Şekil 2.10.1.1. Çalışmamızda kullanılan kekik ( <i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> (link.) Ietswaart).....	42
Şekil 2.10.3.1. Clevenger aparatı.....	44
Şekil 2.10.4.1. Karvakrol, timol ve timokinonun moleküler yapısı.....	46
Şekil 3.2.3.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için çizilen kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 3.2.4.1. ABTS yöntemi için çizilen kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 3.2.5.2.1. Karvakrol, timol ve timokinon için çizilen HPLC kalibrasyon grafikleri.....	57
Şekil 4.2.1.1. Karvakrolün Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 400 µM karvakrol; 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 100 µM Fe <sup>2+</sup> ; sıcaklık 37 °C).....	68
Şekil 4.2.1.2. Timolün Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 400 µM karvakrol; 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 100 µM Fe <sup>2+</sup> ; sıcaklık 37 °C).....	69
Şekil 4.2.1.3. Timokinonun Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 40 µM timokinon; 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 10 µM Fe <sup>2+</sup> ; sıcaklık 37 °C).....	70
Şekil 4.2.2.1. (a) 400 µM karvakrol çözeltisinin kromatogramı (b) 400 µM karvakrol çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı.....	72

<b>Şekil 4.2.2.2.</b> Karvakrolden timokinon oluşum reaksiyonu.....	72
<b>Şekil 4.2.2.3. (a)</b> 400 µM timol çözeltisinin kromatogramı	
<b>(b)</b> 400 µM timol çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı.....	73
<b>Şekil 4.2.2.4.</b> Timolden timokinon oluşum reaksiyonu.....	74
<b>Şekil 4.2.2.5. (a)</b> 40 µM timokinon çözeltisinin kromatogramı	
<b>(b)</b> 40 µM timokinon çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı.....	74
<b>Şekil 4.2.2.6.</b> Timokinondan timohidrokinon ve benzokinonların oluşumu.....	75
<b>Şekil 4.2.3.1.</b> 400 µM karvakrolün Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (karvakrol = 400 µM, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 200 µM, Fe <sup>2+</sup> = 100 µM).....	75
<b>Şekil 4.2.3.2.</b> 400 µM timolün Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (timol = 400 µM, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 200 µM, Fe <sup>2+</sup> = 100 µM).....	76
<b>Şekil 4.2.3.3.</b> 40 µM timokinonun Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (timokinon = 40 µM, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 20 µM, Fe <sup>2+</sup> = 10 µM).....	76
<b>Şekil 4.2.3.4.</b> Karvakrolün oksidasyonun ikinci derece kinetik grafiği.....	77
<b>Şekil 4.2.3.5.</b> Timolün oksidasyonun ikinci derece kinetik grafiği.....	78
<b>Şekil 4.2.3.6.</b> Timokinonun oksidasyonun ikinci derece kinetik grafiği.....	78
<b>Şekil 4.3.2.1.</b> Türevlendirme süresi ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	86
<b>Şekil 4.3.2.2.</b> Türevlendirme süresi ile türevlendirici/çözelti oranı ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	87
<b>Şekil 4.3.2.3.</b> Türevlendirme süresi ile türevlendirici/çözelti oranı ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	88
<b>Şekil 4.3.3.1.</b> 10 µg/L konsantrasyondaki 18 adet DNA baz hasar ürünü standardının GC-MS/MS kromatogramı.....	91
<b>Şekil 4.5.1.1.</b> Farklı H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları...	96
<b>Şekil 4.5.2.1.</b> Karvakrol, timol, timokinon, kekik yağı ve kekik suyunun farklı konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları.....	97
<b>Şekil 4.5.2.2.</b> Farklı kekik ekstraktı konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları.....	98
<b>Şekil 4.5.3.1.</b> A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	101
<b>Şekil 4.5.3.2.</b> 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	101
<b>Şekil 4.5.3.3.</b> 40 µM karvakrol ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	103
<b>Şekil 4.5.3.4.</b> 80 µM timol ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	103
<b>Şekil 4.5.3.5.</b> 10 µM timokinon ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	104

<b>Şekil 4.5.3.6.</b> Kekik suyu ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	104
<b>Şekil 4.5.3.7.</b> Kekik yağı ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	105
<b>Şekil 4.5.3.8.</b> Kekik su ekstraktı ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	105
<b>Şekil 4.5.3.9.</b> Kekik su-metanol ekstraktı ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı.....	106





## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1.1. Bazı hücrelerin içerdiği DNA ve nükleotid çifti miktarı.....	7
Çizelge 2.2.1.1. Reaktif oksijen türleri.....	8
Çizelge 2.2.1.2. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu.....	9
Çizelge 2.4.1. DNA hasarına neden olan iç ve dış kaynaklı etkenler.....	13
Çizelge 2.5.1. DNA onarım mekanizmaları.....	23
Çizelge 2.7.1. Oksidatif DNA hasar ürünlerini ölçüm teknikleri.....	31
Çizelge 2.9.2.1. Vücutta sentezlenebilen antioksidanlar ve işlevleri.....	40
Çizelge 2.10.4.1. Farklı yerlerden toplanan <i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> 'un uçucu yağının karvakrol ve timol içeriği.....	46
Çizelge 3.1.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	48
Çizelge 3.1.2.1. Çalışmada kullanılan araç-gereçler.....	51
Çizelge 3.2.5.1.1. HPLC-DAD gradient hareketli faz programı.....	55
Çizelge 3.2.5.2.1. HPLC-DAD izokratik hareketli faz programı.....	56
Çizelge 3.2.6.1. Fenton reaksiyonu koşulları.....	58
Çizelge 3.2.8.1. GC-MS/MS çalışma koşulları.....	59
Çizelge 3.2.8.2. GC-MS/MS sıcaklık programı.....	59
Çizelge 4.1.1.1. Kekikten hazırlanan numunelerin toplam fenolik madde miktarları....	66
Çizelge 4.1.2.1. Kekikten hazırlanan numunelerin antioksidan kapasite değerleri.....	67
Çizelge 4.1.3.1. Kekikten hazırlanan numunelerin HPLC sonuçları.....	67
Çizelge 4.2.1.1. Karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin 254 ve 273 nm'de molar sönüm katsayıları.....	70
Çizelge 4.2.3.1. Karvakrol, timol ve timokinona ait hız sabiti ve yarılanma süreleri...	79
Çizelge 4.3.1.1. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS verileri.....	80
Çizelge 4.3.2.1. Merkezi kompozit dizaynda kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler.....	83
Çizelge 4.3.2.2. DNA oksidatif hasar ürünlerinin türevlendirilmesinin optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn tablosu.....	84
Çizelge 4.3.2.3. Önemli parametrelere göre oluşturulan model denklemleri.....	85
Çizelge 4.3.2.4. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin türevlendirilmesi için optimum değerler.....	89
Çizelge 4.3.2.5. DNA oksidatif baz hasar ürünleri için pik alanındaki değişim.....	89
Çizelge 4.3.3.1. DNA oksidatif baz hasar ürünleri için kalibrasyon grafiği denklemleri ve çalışılan doğrusal aralık değerleri.....	90
Çizelge 4.3.3.2. DNA oksidatif baz hasar ürünleri için tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve tekrarlanabilirlik değerleri.....	92

<b>Çizelge 4.4.1.</b> 100 µg buzağı timüs DNA'sındaki ve üzerine antioksidan madde eklendiğindeki DNA oksidatif baz hasar ürünleri.....	94
<b>Çizelge 4.4.2.</b> 100 µg buzağı timüs DNA'sında Fenton reaksiyonu ortamında ve antioksidan madde içeren ortamda oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünleri.....	95
<b>Çizelge 4.5.2.1.</b> Hücre kültürü ortamına eklenecek antioksidanların toksik olmayan konsantrasyonları.....	98
<b>Çizelge 4.5.3.1.</b> A549 hücre kültürü ortamında ve 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eklenen ve eklenmeyen hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA).....	100
<b>Çizelge 4.5.3.2.</b> A549 hücre kültürü ortamında antioksidan varlığında 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eklendikten sonra hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA).....	102
<b>Çizelge 4.5.4.1.</b> BEAS-2B hücre kültürü ortamında kontrol, 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve antioksidan varlığında 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eklendikten sonra hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA).....	107

## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan atom ya da atom gruplarıdır. Kararsız olduklarından, tüm organizmaların canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri sürdürebilmeleri için gerekli olan, tüm genetik bilgileri taşıyan DNA'da, hücrelerde, proteinlerde hasar oluşturan zincir reaksiyonlar başlatırlar. Serbest radikaller, vücutta metabolizma sırasında ve birçok dış etken tarafından meydana getirilebilen kimyasal ürünlerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Bunlara ve oksidan olan fakat radikalik yapıda olmayıp, radikalik yapıya kolaylıkla dönüşebilen maddelerin tümüne reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) adı verilmektedir. Organizmada reaktif oksijen türlerinin yanı sıra reaktif nitrojen türevleri (Reactive Nitrogen Species, RNS) de oluşmaktadır.

Normal şartlarda hücrelerde oksidanlar ve antioksidanlar arasında korunan bir denge vardır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Ancak oksidanların aşırı üretimi veya antioksidan savunmanın azalması sonucu oluşan dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılan duruma neden olur ve bu süreçte hücrel hasar düzeyi artar. DNA'da hasar oluşumu, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığın başlıca nedeni olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar DNA'sı hasar gören sağlıklı hücrelerin malign hücrelere dönüşebildiğini göstermektedir. Akciğer de oksidanlardan en çok etkilenen organlardan biridir. Çünkü hava kirliliği ve kan kaynaklı oksidanların etkisindedir. Ayrıca en fazla oksijen ile karşılaşan organdır. Bu nedenlerden dolayı akciğer kanseri en sık görülen kanser türleri arasındadır. Ülkemiz de akciğer kanseri görülme oranı en yüksek ülkelerden biridir.

Reaktif oksijen türlerinin DNA'da oluşturduğu hasar ürünlerinin kantitatif tayini için birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak, GC/MS ve LC/MS gibi kütle spektrometri ile entegre kromatografik teknikler, aynı anda çok sayıda maddenin analiz edilmesi ve yüksek duyarlılık gibi önemli avantajlara sahiptir. Özellikle GC/MS farklı türlerdeki

oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılabilme avantajına sahiptir. Oksidatif DNA hasar ürünlerinin miktarının tayini, hem oksidatif DNA hasarı hem de DNA onarım seviyesi hakkında bilgi vermektedir.

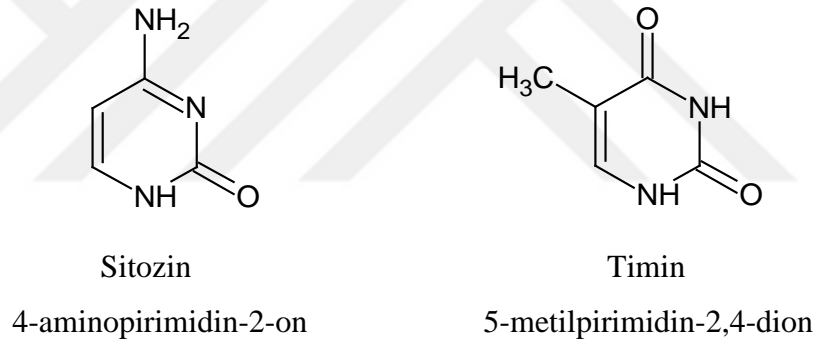
Reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek oksidatif hasarı önleyebilen ya da geciktiren antioksidan bileşiklerin tedavide yardımcı olarak kullanılması son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Bu amaçla çok sayıda antioksidan bileşik içeren doğal ürünler ve tıbbi bitkiler satışa sunulmaktadır. Çeşitli hastalıkların önlenmesinde bitkisel ürün ve bitkisel kaynaklı etken maddelerin doğal olduğu için zararlı olmadığı düşüncesi ile bilinçsiz kullanımı artmaktadır. Bitkilerdeki antioksidan özellikte bileşiklerin çoğunun yapı ve etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamıştır ve pek çok etken maddenin hem oksidan hem de antioksidan özellikleri bulunabilmektedir. Çoğu bitkisel ürünün toksisiteleri ve insan sağlığına olası etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bazı bitkisel ürünlerin in vitro bakteri sistemlerinde ve hücre kültürlerinde yüksek konsantrasyonlarda oksidatif hasarı artırabileceği, mutajenik olabildikleri, DNA hasarını indükledikleri belirtilmişse de tersini belirten çalışmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde yetişen *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link.) Ietswaart türü kekikten uçucu yağ, yağ altı suyu ve ekstrakt elde edilerek antioksidan özellikleri ve fenolik madde içerikleri tespit edilmiştir. Hazırlanan bu numunelerin ve karvakrol, timol, timokinon fenolik maddelerinin standartlarının oksidatif DNA hasarı oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Sağlıklı (kontrol grubu) ve malign (hastalık grubu) akciğer hücrelerinde bulunan olası tüm oksidatif DNA hasar ürünlerini tespit etmek için örnek hazırlama ve GC-MS/MS ile tayin yöntemi geliştirilmiştir. Böylece oksidatif DNA hasarının göstergesi olan ve biyomarkör olarak değerlendirilebilecek hasar ürününü/ürünleri çok düşük konsantrasyonlarda tayin edilmesi sağlanmıştır. Farklı miktarlardaki bitki ekstraktlarının ve standart fenolik maddelerin hücre kültürü ortamında, oksidatif DNA hasar ürünleri üzerinde etkisi incelenerek, antioksidan maddelerin reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirme özellikleri ortaya konmuştur.

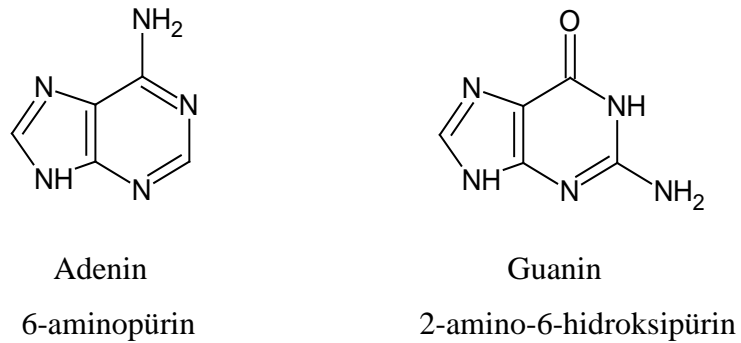
## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. DNA'nın Yapısı

Deoksiribonükleik asit (DNA), tüm organizmaların canlılık işlevlerini ve biyolojik gelişmelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan, tüm genetik bilgileri taşıyan biyomakromoleküldür. DNA'da tekrarlayan temel birim, deoksiribonükleotiddir. Her bir birim, şeker olarak bir deoksiriboz, bir fosfat ve heretosiklik dört bazdan birini içerir. Pürin yapısında, adenin (A) ve guanin (G), pirimidin yapısında, timin (T) ve sitozin (C) bazlarını içerir (Şekil 2.1.1. ve Şekil 2.1.2.). Bu bazlardan biri, 2'-deoksiribozun 1'karbonuna (1'-C)  $\beta$ -N-glikozid bağı ile bağlıdır. Bu yapıya nükleozid adı verilir. Fosfat grubu ise şekerin 5' veya 3' karbonuna bağlıdır ve fosforillenmiş nükleozid, nükleotid olarak adlandırılır (Akçay 2006, Hari ve ark. 2012, Liang ve Wnuk 2015).



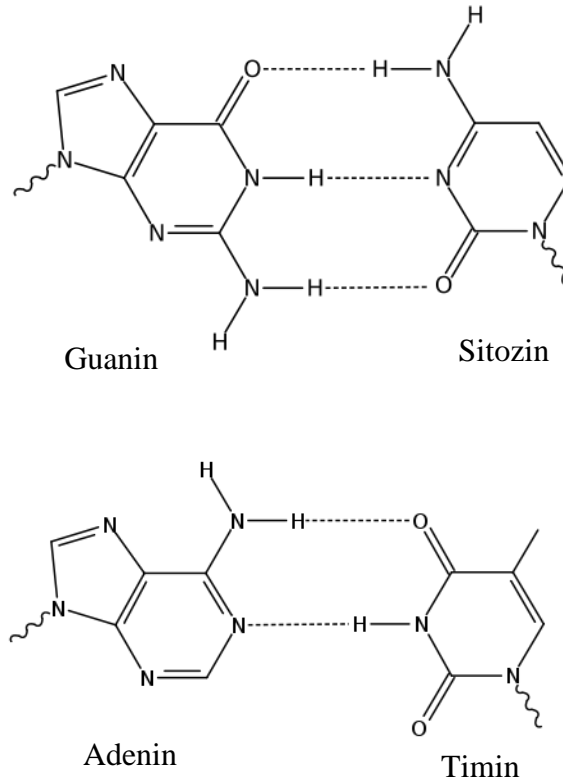
Şekil 2.1.1. DNA'da bulunan pürin yapısındaki bazlar



Şekil 2.1.2. DNA'da bulunan pirimidin yapısındaki bazlar

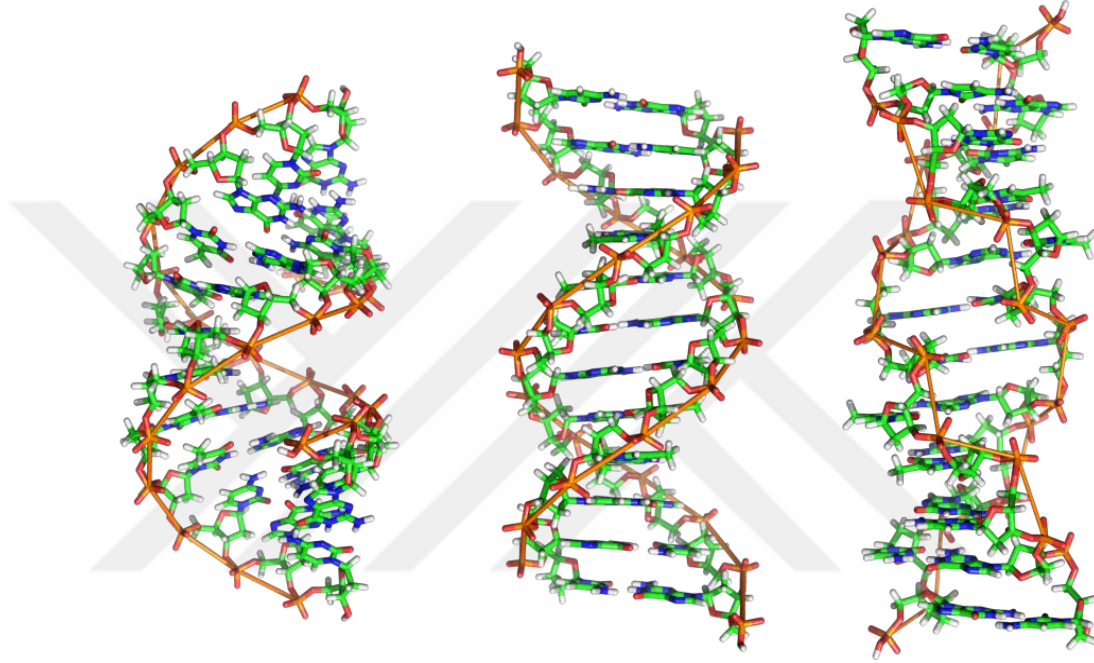
Çift zincirli, sarmal yapıdaki molekülün iki zinciri, pürin ve pirimidin bazları arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda bulunur. Bu nedenle, sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özellik taşımaktadır. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifikdir. Her zaman adenin karşısında timin ve guanin karşısında sitozin olacak şekilde eşleşmeler gerçekleşmektedir. Bu nedenle çift zincirli yapının bir zincirindeki baz dizilimi bilindiğinde, diğer zincirin baz dizilimi belirlenebilmektedir (Hari ve ark. 2012, Liang ve Wnuk 2015).

DNA heliks yapısının çeşitli nedenlerle bozulmasına denatürasyon adı verilmektedir. Bu bozulma 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. Guanin ve sitozin arasında üç hidrojen bağı ( $G \equiv C$ ), adenin ve timin arasında iki hidrojen bağı ( $A = T$ ) bulunur (Şekil 2.1.3.). Bu nedenle yüksek oranda guanin ve sitozin içeren DNA daha yüksek sıcaklıkta denatüre olur (Akçay 2006).



**Şekil 2.1.3.** Guanin ile sitozin ve adenin ile timin arasında oluşan hidrojen bağları

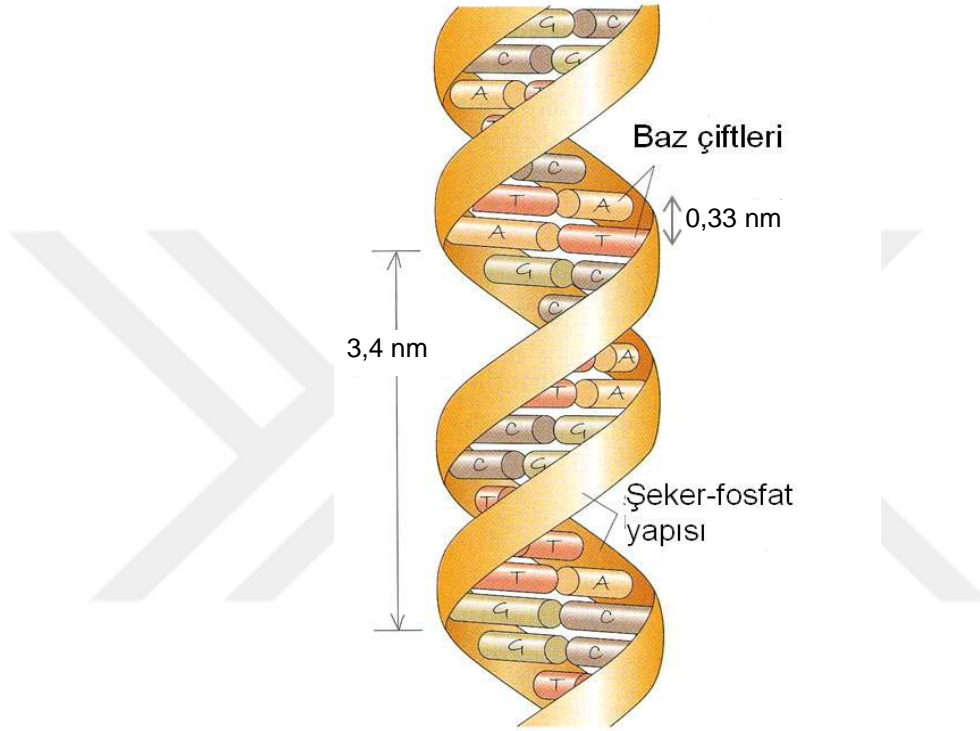
Bir eksen etrafında dönen çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri 5'→3' yönüne doğru, diğeri ise 3'→5' yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Sarmal içinde iki zincir arasındaki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmaktadır. DNA molekülü çeşitli çift sarmal yapılarda bulunabilir. Doğada üç farklı DNA üç boyutlu konformasyonu olduğu düşünülmektedir. Bunlar A-DNA, B-DNA ve Z-DNA olarak adlandırılırlar (Şekil 2.1.4.).



**Şekil 2.1.4.** A-DNA, B-DNA ve Z-DNA yapıları

James D. Watson ve Francis Crick tarafından tanımlanmış olan B-DNA'nın hücrelerde hakim biçim olduğu görüşü yaygındır. 2,37 nm genişliğindedir ve 10 baz çifti için 3,4 nm uzanır (Richmond ve Davey 2003). DNA molekülünün B şekli her 360°'lik dönüşünde 10,4 baz çifti içeren sağ el dönüşlü sarmal yapısındadır (Şekil 2.1.5.). Benzer şekilde sağ el dönüşlü sarmal yapısında olan A şeklinin her bir dönüşünde 11 baz çifti bulunmaktadır. Sol el dönüşlü sarmal yapıda olan ve her dönüşünde 12 baz bulunan Z-DNA, DNA yapısının özel bölgelerinde kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. A-DNA, B-DNA molekülüne göre daha kısa ve kalın, Z-DNA ise, B-DNA molekülüne göre daha ince ve uzundur. Çift sarmal yapıdaki DNA, endotermik bir olay ile molekül içerisinde aşırı sarmal yapılar oluşturarak süper sarmal olarak adlandırılan ileri derecede sarmal yapılar meydana getirebilmektedir. Süper sarmal yapı, pozitif veya negatif süper sarmal

olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelebilmektedir. Serbest DNA molekülünden daha dayanıklı bir yapıya sahip olduğu için negatif süper sarmal yapı taşıyan DNA molekülünün biyolojik önemi bulunmaktadır. Negatif süper sarmal yapı, DNA replikasyonu için önemli olan çift sarmalın kısmen açılması sonucunda oluşmaktadır (Akçay 2006).



**Şekil 2.1.5.** DNA'nın ikili sarmal yapısı

DNA tüm hücrelerin ana bileşenidir ve hücrenin kuru ağırlığının %5-15'ini oluşturur. Ökaryot hücrelerde zarla çevrilmiş bir çekirdek yer alır ve kromozomal DNA, hücrenin çekirdeğinde bulunur. İnsan hücresi 23 çift kromozom içerir. En küçük insan kromozomu 50 milyon, en büyüğü 263 milyon baz çifti içerir. *E. coli* gibi bakteriler her hücrede yaklaşık 1 mm uzunluğunda 4 milyon nükleotid çiftinden oluşan DNA içerirler. İnsan hücresi 174 cm uzunluğunda ve 6 pg ağırlığında DNA içerir. Türden türe hücrenin içerdiği DNA miktarı ve uzunluğu değişir (Parimoo ve Parimoo 2003). Çeşitli hücre türlerinin içerdiği DNA miktarı ve nükleotid çifti sayısı Çizelge 2.1.1.'de verilmiştir.



**Çizelge 2.1.1.** Bazı hücrelerin içerdiği DNA ve nükleotid çifti miktarı

Hücre türü	Organizma	DNA/hücre (pg)	Nükleotid çifti sayısı
Bakteriyofaj	T4	$2,4 \times 10^{-4}$	$0,17 \times 10^6$
Bakteri	<i>E. coli</i>	$4,4 \times 10^{-3}$	$4.2 \times 10^6$
Mantar	<i>N. crassa</i>	$1,7 \times 10^{-2}$	$20 \times 10^6$
Eritrosit	Tavuk	2,5	$2000 \times 10^6$
Lökosit	İnsan	6	$6000 \times 10^6$

İnsan hücresinde yaklaşık 30000 gen vardır. Ancak tüm hücrelerdeki tüm genler aktif değildir. Genlerin çoğunun sahip olduğu fonksiyonlar şu anda tam olarak bilinmemektedir. Hücrelerdeki genlerin boyutu değişkendir. Genlerin boyutu birkaç baz çiftinden binlerce baz çiftine kadar değişebilir (Chaisson ve ark. 2015).

## 2.2. Reaktif Oksijen Türleri

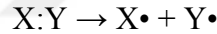
### 2.2.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan atom ya da atom gruplarıdır. En önemli özellikleri kararsız, kısa ömürlü ve reaktif olmalarıdır. Bu nedenle DNA'da, hücrelerde ve proteinlerde hasar oluşturan zincir reaksiyonları başlatırlar. Serbest radikaller; vücutta metabolizma sırasında, virüsler, iyonlaştırıcı radyasyon, UV ışını, sigara, enfeksiyonlar, stres, kimyasalların etkisi altında kalma, ilaç toksikasyonları, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, ozon, karbon monoksit gibi birçok etken tarafından meydana getirilebilen kimyasal ürünlerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) adı verilmektedir. ROS, oksijen radikallerini ve oksidan olan fakat radikal yapıda olmayan ve/veya radikalik yapıya kolaylıkla dönüşebilen maddelerin tümünü kapsayan bir terimdir (Fung ve ark. 1997, Buonocore ve ark. 2010). Organizmada reaktif oksijen türlerinin yanı sıra reaktif nitrojen türevleri (Reactive Nitrogen Species, RNS) de oluşmaktadır. RNS azot oksit, azot dioksit radikallerini ve HNO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gibi radikal yapıda olmayan maddelerin tümünü kapsayan bir terimdir. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri Çizelge 2.2.1.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.2.1.1. Reaktif oksijen türleri**

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil radikali	$\bullet OH$	Lipid hidroperoksit	LOOH
Peroksil radikali	$ROO\bullet$	Hipohalöz asit	HOX
Alkoksil radikali	$RO\bullet$	N-halojenli aminler	R-NH-X
Semikinon radikali	$HQ\bullet$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Organik radikaller	$R\bullet$	Ozon	$O_3$
Organik peroksit radikali	$RCOO\bullet$	Azot dioksit	$NO_2$
Nitrik oksit	$NO\bullet$	Hipokloröz asit	HOCl
		Peroksinitrit	$ONOO^-$

Serbest radikaller, kovalent bağın homolitik yarılmaması, bir molekülün elektron kaybetmesi veya bir moleküle elektron eklenmesi ile oluşabilmektedirler. Bu molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yarılmaması sonucu eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.



Molekülün yapısındaki atomlardan birisinden elektron uzaklaştırılması veya bir moleküle elektron eklenmesi sonucu da serbest radikaller oluşmaktadır.

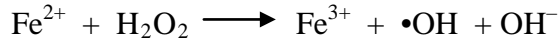
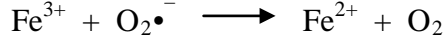


Kararsız bir yapıya sahip olan serbest radikaller, elektron konfigürasyonlarını dengelemeleri gerektiğinden çok reaktifler. Tek elektronunu bir başka moleküle verebilen bu radikaller, bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti de oluşturabilmektedirler. Sonuçta radikal olmayan bir yapı, elektron vererek radikalik yapıya dönüşebilmektedir. En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) Haber-Weiss reaksiyonu ve metallerin varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşmaktadır (Çizelge 2.2.1.2.) (Fung ve ark. 1997, Sözman 2006 Kruk ve ark. 2010).

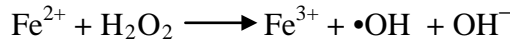
### Çizelge 2.2.1.2. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu

---

Haber-Weiss reaksiyonu:



Fenton reaksiyonu:



Biyolojik sistemlerde oksijen taşınması, ATP üretimi, DNA ve klorofil sentezinde önemli role sahip olan demirin serbest formları canlı hücrelerde toksik etki yapabilmektedir. Bu toksik etki sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri DNA'da ve lipidler de hasar oluşmasına yol açmaktadır. Tüm hücreler serbest demirin toksik etkisini yok eden ve demirin fazlasını toksik olmayan formlarda hücre içinde depolayan mekanizmalara sahiptir (Albertsen 2006). Birçok metal doğal olarak vücutta kelat oluşturmuş formda bulunur. Örneğin; bakır çeşitli enzimlerde, demir ise ferritin gibi proteinlerde, miyogloblin ve hemoglobinin porfirin halkasında kelat yapısında bulunmaktadır (Fraga 2005). Kelat oluşumu antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunmaktadır. Ancak travma, toksinler, hastalık gibi çeşitli nedenlerle oksidatif reaksiyonları katalizleyen serbest metal iyon formlarına dönüşümler gerçekleşebilmektedir. Katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Lavelli ve ark. 2000).

### 2.2.2. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

#### 2.2.2.1. Elektron taşıma zinciri:

Normal koşullarda mitokondri, oksijeni suya indirgeyerek etkisizleştirmektedir. Elektron taşıma zincirinde yer alan pek çok bileşik oksijen ile tepkimeye girerek süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) oluşumuna neden olmaktadır. Normal koşullarda hücrenin

savunma sistemleri ile yok edilebilen  $O_2^{\bullet-}$ , oksidatif stres durumunda savunma sistemlerinin yetersiz kalması sonucu mitokondride hasar oluşturmaktadır (Sözmen 2006).

#### **2.2.2.2. Dış etkenler:**

Radyasyon, çevre kirleticileri, pestisitler, metaller, çeşitli tıbbi tedavi yolları, kontamine sular, sigara ve alkol gibi birçok dış etken çeşitli mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin oluşmasına yol açmaktadır (Kaur ve Kapoor 2001, Sözmen 2006).

#### **2.2.2.3. Enzimatik tepkimeler:**

Oksijen kullanılan tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar ve oksijenazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu enzimlerin katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Vücutta enzimatik tepkimelerle endojen olarak oksijen metabolitleri meydana gelmektedir (Sözmen 2006). Vücutta, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin aktivitesinin bir sonucu olarak da reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Meydani 2001).

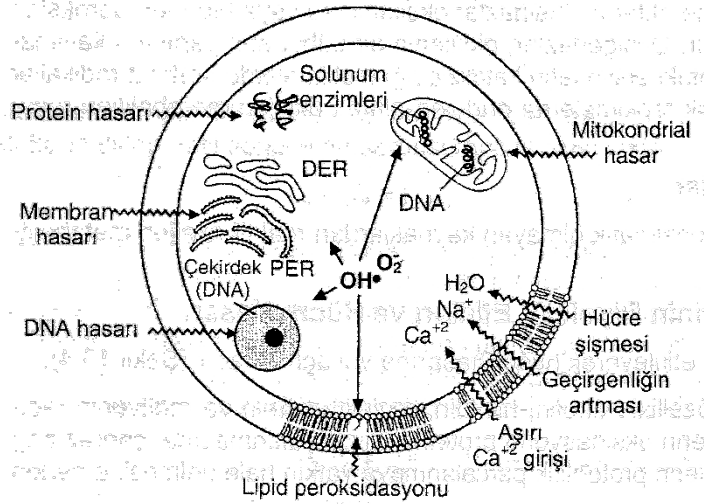
#### **2.2.2.4. Enzimatik olmayan tepkimeler:**

Otooksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur (Lee ve ark. 2003). Otooksidasyon tepkimeleri sonucu, katekolaminler, dehidrokoenzim Q, tetrahidrobiopterin, indirgenmiş flavin,  $Fe^{2+}$  gibi maddelerle oksijen molekülünün reaksiyonu sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan da reaktif oksijen türleri oluşmaktadır (Sözmen 2006). Serbest radikallerin oksijenle reaksiyonu oldukça hızlıdır ve bu reaksiyonların başlangıcı için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri ve fosfolipidler otooksidasyona daha eğilimlidirler (Reis ve Spickett 2012).

### 2.3. Oksidatif Stres

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller, normalde radikalleri etkisiz hale getiren antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Oluşan serbest radikaller arasında hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ) en reaktif olan serbest radikaldir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlusudur (Fung ve ark. 1997).

Serbest radikaller yaşam için gereklidir ve vücutta bir denge halinde bulunurlar. Eğer serbest radikal üretimi kontrolsüz bir şekilde artarsa, hücrelere ve bunların DNA'sına zarar veren, zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşumuna yol açabilecek bir dizi reaksiyona neden olabilmektedir (Cooke ve ark. 2003). Serbest radikaller, hücresel yapıları etkileyerek hücre hasarına yol açmaktadır (Sözmen 2006). Şekil 2.3.1.'de serbest radikallerin hücrede oluşturduğu hasarlar görülmektedir.



**Şekil 2.3.1.** Serbest radikallerin hücresel hedefleri

Proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler radikal hasarına açıktır. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına, çapraz bağ oluşumuna, agregasyona neden olmaktadır. Memeli hücre membranları oksidatif hasara karşı oldukça duyarlı olan

büyük miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir. Bu yağ asitlerinin oksidasyonu hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir.

Çeşitli nedenlerle oluşan serbest radikaller hücre çekirdeğinde başlıca DNA ile tepkimeye girmektedir. Nükleik asit yapısındaki baz değişimleri veya DNA zincir kırılmaları sonucu kromozomal yapıda oluşan değişiklikler sitotoksositeye neden olmaktadır (Forlenza ve Miller 2006). Oksidatif stres durumunda, farklı mekanizmalar ile oluşan reaktif oksijen türlerinin, DNA'da farklı mekanizmalarla; baz ve şekerlerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere (AP; apürinidik/apirimidinik bölge), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003).

Reaktif oksijen türleri ve özellikle hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ), lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi tüm hücresel moleküllerle reaksiyona girerler (Halliwell ve Gutteridge 2005). Bu reaksiyonla ikinci bir radikal oluşur ve bu radikal diğer moleküller ile reaksiyona girerek radikal zincir reaksiyonunu devam ettirerek oksidatif hasar oluşumuna neden olur. Hasar oluşumu yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile karakterize hastalıkların başlıca nedeni olarak görülmektedir (Forlenza ve Miller 2006).

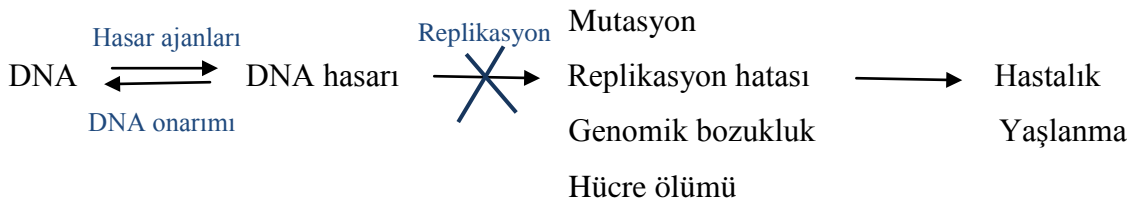
#### **2.4. Oksidatif DNA Hasarı ve Nedenleri**

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde iç kaynaklı (endojen) veya dış kaynaklı (ekzojen) faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır (Watson ve ark. 2008). DNA hasarına neden olan etkenler Çizelge 2.4.1.'de verilmiştir. Genomik DNA'nın bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır. DNA kararlı bir molekül olmasına rağmen yaşam boyunca fizyolojik şartlarda kendiliğinden gelişen kimyasal oksidatif hasara uğrayabilir. İnsan vücudundaki her hücre DNA'sı günde 1000-10000 kez oksidatif hasara maruz kalmaktadır (Halliwell 2002). DNA meydana gelen oksidatif hasar, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır (Sastre ve ark.2000).

**Çizelge 2.4.1.** DNA hasarına neden olan iç ve dış kaynaklı etkenler

İç kaynaklı etkenler	Dış kaynaklı etkenler
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar</li><li>2. Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon</li><li>3. Baz kayıpları: depurinasyon/depirimidinasyon 10 000 /hücre/gün</li><li>4. Oksidatif Hasar: 100 000 /hücre/gün</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Kimyasal maddeler: aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici maddeler, vinil klorür v.b.</li><li>2. Fiziksel etkenler: UV ışını, iyonize radyasyon v.b.</li></ol>

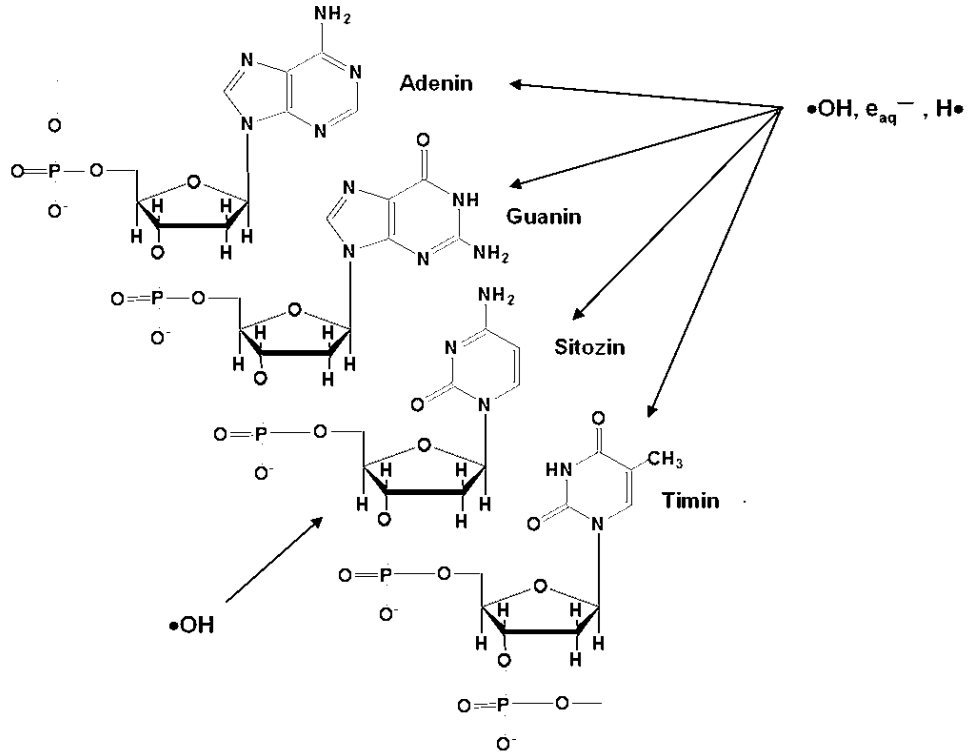
Reaktif oksijen türleri, DNA’da oksidatif hasar oluşturarak DNA’nın yapısal değişimine yol açar. Zincir kırıkları, baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme, delesyon, baz katılımı, dizi amplifikasyonu gibi yapısal hasarlar meydana gelir. Oksidatif hasara uğrayan DNA antijenik karakter taşıyabilir ve anti DNA antikorlarının oluşumuna neden olabilir (Dizdaroğlu 1991). Reaktif oksijen türleri doğrudan DNA onarım enzimlerini ve DNA polimeraz enzimini de okside edebilir. Bunun sonucunda DNA onarım mekanizmasının etkinliği azalır ve replikasyonun doğruluğu korunamaz. Reaktif oksijen türleri, DNA’da doğrudan hasar yaparak kanser gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca hücreler arası sinyal iletimini aktive/inhibe ederek, hücre çoğalmasının kontrolünde çok önemli olan hücreler arası etkileşime etki eder. Bunun sonucunda hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozis/nekroz ile hücre ölümüne müdahale ederek kanser oluşumuna yol açabilir (Wu ve ark. 2004). Sonuç olarak, oksidatif stres durumunda DNA’nın onarımı, replikasyonu ve transkripsiyonu bozulur. Şekil 2.4.1.’de DNA’da replikasyon doğruluğunun korunamaması ve olası sonuçları gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.1.** DNA’da replikasyon doğruluğunun korunamaması ve olası sonuçları

### 2.4.1. DNA baz hasarı

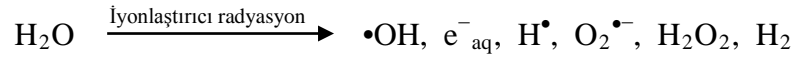
Reaktif oksijen türleri doğrudan DNA'nın yapısındaki pürin, pirimidin bazlarına saldırdığında bazlarda modifikasyonlar meydana gelir. Örneğin, hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ) bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına katılarak çeşitli ürünler oluşturur (Simic 1994, Dizdaroğlu 2012a). Hidroksil radikalının saldırı yapacağı bölgeler Şekil 2.4.1.1.'de gösterilmiştir. Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarının çift bağlarına difüzyon kontrollü olarak bağlanır. Hidroksil radikali saldırılarının yaygınlığı oksidasyona uğrayacak molekülün elektron yoğunluğuna bağlıdır. Elektrofilik yapısı nedeniyle, hidroksil radikali tercihen en yüksek elektron yoğunluğu olan bölgeye eklenir (Sonntag 2006). DNA ile hidroksil radikallerinin etkileşimi durumunda radikallerin yaklaşık %80'i bazlara eklenir ve %20'den az kısmı da şeker grubundan bir hidrojen atomu alır (Saito ve ark. 2000).



Şekil 2.4.1.1. DNA'nın oksidatif hasara uğrayabileceği bölgeler



Hücreler UV ışına maruz kaldığında da DNA hasarı oluşabilir. UV ışın etkisiyle iki şekilde DNA hasarı meydana gelebilir. UV ışın  $H_2O_2$ 'e etki ederek hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) meydana getirebilir veya doğrudan pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilir. Hidroksil radikalleri yanında  $H\bullet$  ve  $e^-_{aq}$  da DNA'ya etki eder. İyonize radyasyonun suyun homolizine neden olarak, hidroksil radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir (Dizdaroğlu 1991).

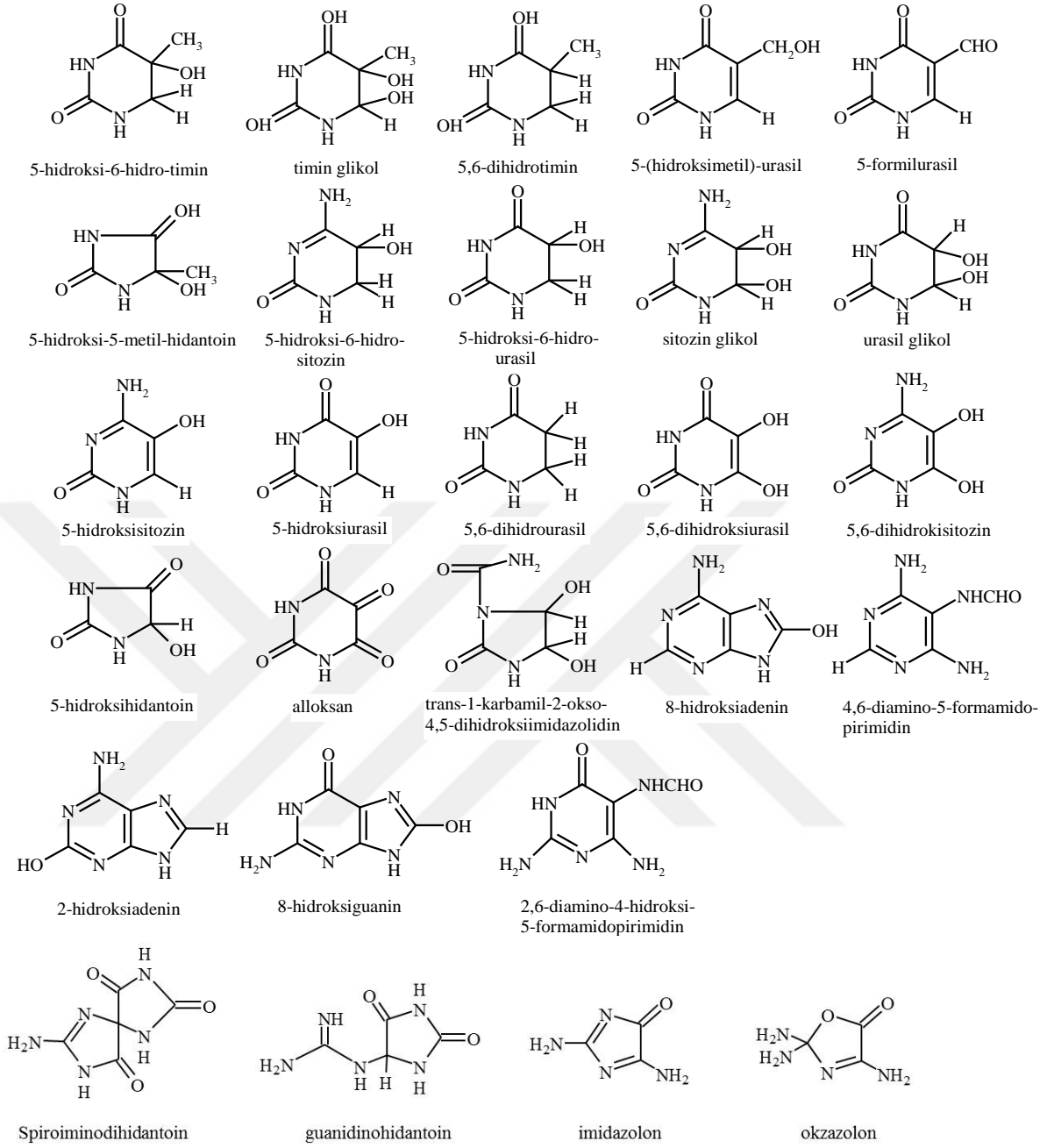


Hidroksil radikalının DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan hidroksil radikalının hücre içinde difüze olarak çekirdeğe geçme olasılığı azdır. Olası mekanizma, membranı kolayca geçebilen  $H_2O_2$ 'in hücre çekirdeğinde demir/bakır iyonları ile tepkimeye girerek (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $Fe^{2+/3+}$  ve  $Cu^{+2+}$  iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbest hale geçerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif geçiş metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile  $H_2O_2$ 'in DNA üzerinde reaksiyona girmesinden oluşan hidroksil radikalleri, hidroksil radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, hidroksil radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir. Doku kültür ortamının  $Fe^{3+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyon konsantrasyonunun artırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin (deferoksamin gibi) kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (Halliwell ve Aruoma 1991, Halliwell 2006). DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir şelatörleri ve radikal temizleyicilerinin birlikte kullanılmasının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür (Halliwell 2006).

$\text{Cu}^{2+}$  iyonları özellikle DNA'nın guanin-sitozince zengin bölgelerine bağlanır ve guaninin  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile tepkimeye girmesi sonucunda guanin baz hasarı oluşur (Halliwell and Auroma 1991).

Hidroksil radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) çok daha seçicidir (Cooke ve ark. 2003).  $^1\text{O}_2$ , dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-hidroksiguanin ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGuanin) oluşturmaktadır (Cadet ve ark. 2003). Hücrede DNA ile birlikte bulunan  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının bazı fenollerle reaksiyona girmesi ile reaktif oksijen türleri oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA baz-fenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir.

Reaktif oksijen türleri DNA'da Şekil 2.4.1.2.'de gösterilen 25'ten fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (Dizdaroğlu 2012b). Hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksiguanin (8-OHG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi, 2002).



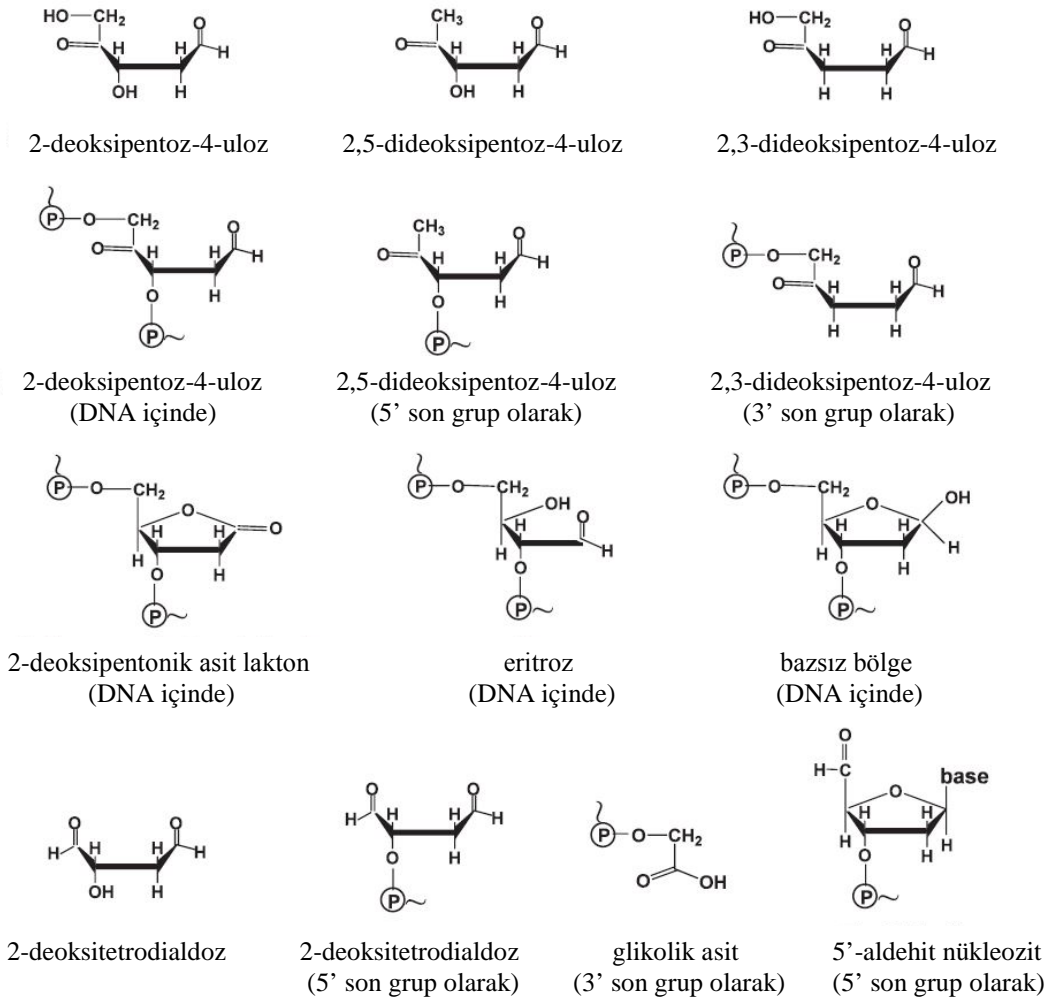
**Şekil 2.4.1.2.** DNA bazlarının oksidatif hasar ürünleri

### 2.4.2. DNA şeker hasarı

DNA makromolekülünün yapısında bulunan deoksiriboz şekerlerin radikaller tarafından saldırıya uğraması sonucunda da birçok ürün oluşur. Hidroksil radikali, DNA'daki şekerlerin her bir karbon atomundan bir H atomunu uzaklaştırarak karbon merkezli radikaller oluşturur. Bu radikaller O<sub>2</sub> varlığında hızla şeker peroksil radikallerine

dönüşürler ve dehidratasyon, C-C bağlarının kopması, yeniden düzenlenme gibi bir seri reaksiyonla karbonil bileşiklerini oluştururlar. Deoksiriboz radyasyona maruz bırakıldığında karbonil ve dikarboniller oluşur. Deoksiriboz türevli radikallerin DNA'da abazik bölge oluşumuna zincir kırılmalarına yol açtığı saptanmıştır (Halliwell ve Gutteridge 2005, Dexheimer 2013).

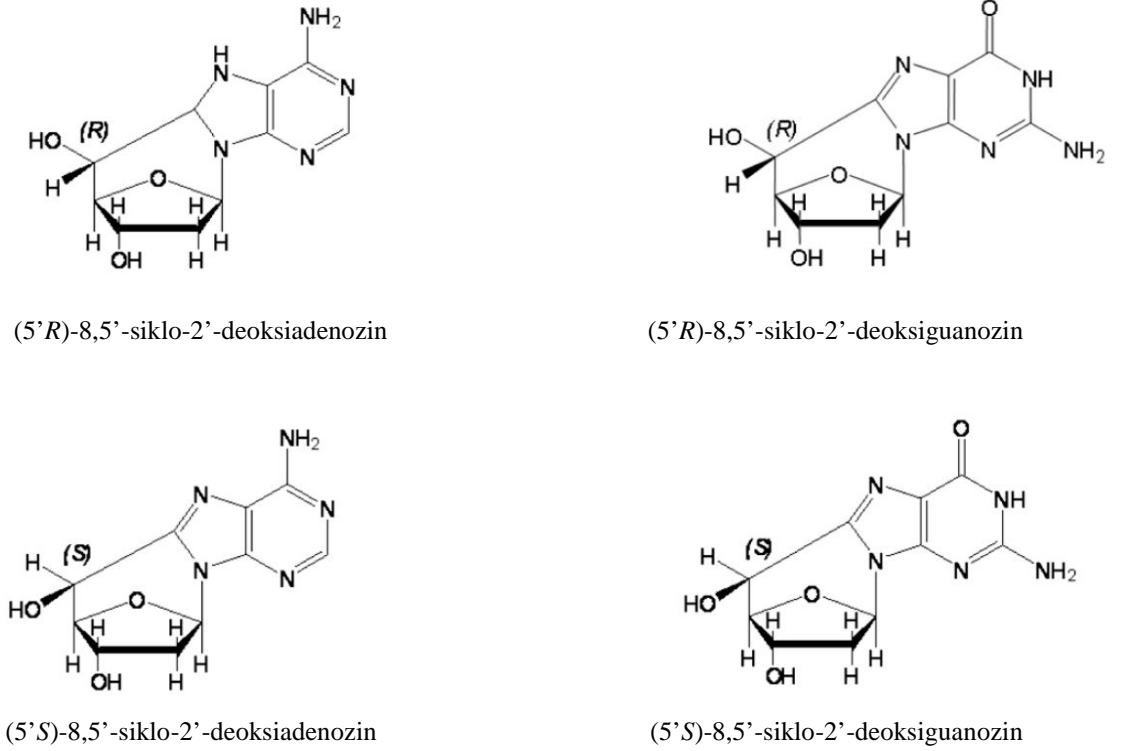
Birçok karbonhidrat gibi 2-deoksiriboz da  $Fe^{2+}$  bağlanma özelliğine sahip olduğundan Fenton reaksiyonu sırasında oluşan hidroksil radikallerinin özellikle 2-deoksiriboz üzerine etkisi vardır. Reaktif oksijen türleri deoksiriboza saldırarak ile 10'dan fazla oksidatif hasar ürününün oluşmasına yol açar (Şekil 2.4.2.1.) (Dizdaroğlu ve ark. 2002). Baz hasar ürünleri kadar olmasa da, bu ürünler de DNA'nın uğradığı oksidatif hasarın ölçüsünü belirlemek için kullanılabilirler.



Şekil 2.4.2.1. Başlıca oksidatif DNA şeker hasar ürünleri

### 2.4.3. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler

Bu hasar ürünleri, C5'-merkezli şeker radikalinin aynı pürin nükleozidindeki C8 pozisyonuna eklenmesi ile meydana gelir. Oluşan molekül içi halkalanmayı oksidasyon takip eder ve 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin (siklo-dG) ve 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin (siklo-dA) ardışık lezyonları oluşur (Şekil 2.4.3.1.). DNA yapısındaki şeker ve baz arasında fazladan bir kovalent bağ oluştuğu için bu lezyonların oluşumu DNA'da hem baz hem de şeker hasarına neden olur (Jaruga ve Dizdaroğlu 2010, Zaliznyak ve ark. 2012). Oksijenin C5'-merkezli radikal ile yaptığı difüzyon kontrollü reaksiyon öncelikli olduğundan, oksijen varlığında üretilmezler (Evans ve ark. 2004, Brooks 2007).

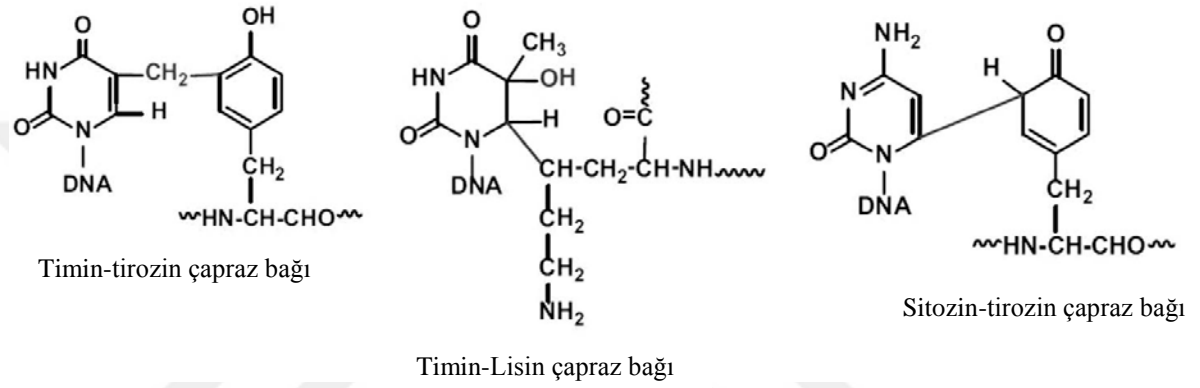


Şekil 2.4.3.1. Başlıca 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidler

### 2.4.4. DNA-protein çapraz bağlanmaları

Hücre çekirdeğindeki proteinlerin de serbest radikallerin saldırısına uğradığı bilinmektedir. Oluşan protein türevli radikal, baz türevli radikal ile çapraz bağlanarak

DNA-protein çapraz bağlanması gerçekleşir. Hücrelerin serbest radikal üreten kaynaklara maruz kalmaları sonucu kovalent DNA-protein çapraz bağlanmaları oluşabilir (Şekil 2.4.4.1.) (Barker ve ark. 2005, Dizdaroğlu ve Jaruga 2012). Bu oluşum kromatinin bozulmasına neden olur. Reaksiyon ya DNA baz radikalinin proteinin aromatik amino asidine eklenmesi ile ya da DNA baz radikali ile bir amino asit radikalinin kombinasyonu sonucu oluşur (Dizdaroğlu ve Jaruga 2012, Shoulkamy ve ark. 2012).

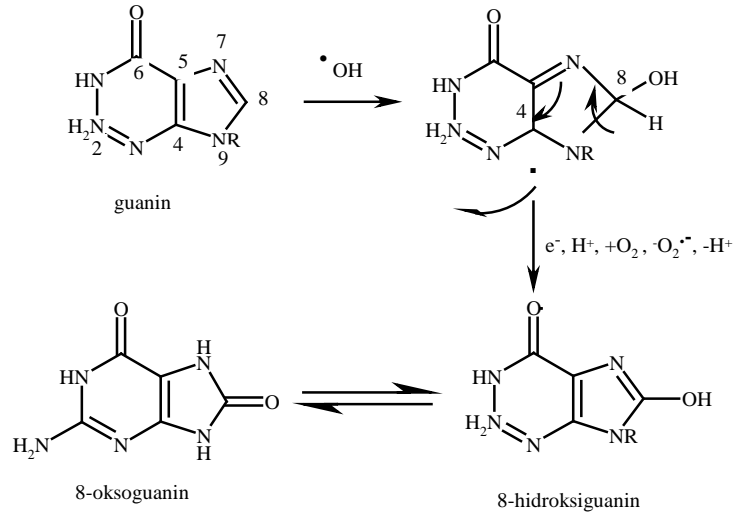


**Şekil 2.4.4.1.** Başlıca DNA-protein çapraz bağlanmaları

### 2.4.5. 8-hidroksiguanin oluşumu

$Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonları en çok guanin-sitozin bakımından zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanine yüksek afinite ile bağlandığını ve  $H_2O_2$  ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığını gösterilmiştir (Dizdaroğlu 2012).

Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonlaşma potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (McDorman ve ark. 2005). Modifiye bir baz olan 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua), reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. Bu hasar ürününü oluşumu Şekil 2.4.5.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.5.1.** 8-hidroksiguanin oluşumu

Reaktif oksijen türlerinin DNA’da yaptığı bu baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen 8-hidroksiguanindir. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen veya ekzojen kaynaklı reaktif oksijen türleri tarafından DNA’da oluşan bir mutajendir.

Hidroksil radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluşturur. Hidroksil radikalının C-8’e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-OH), bir elektron ve proton kaybederek 8-hidroksiguanine yükseltgenir veya bir elektron ve bir proton alarak indirgendikten sonra imidazol halkasının açılması ile 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidoprimidin’e (FapyGua) dönüşür (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi 2002, Yokuş ve Çakır 2012). Düşük  $\text{O}_2$  konsantrasyonlarında 8-OH-Gua/FapyGua oranı azalır (Kasai 1997).

Guaninde oluşan bu hasar DNA replikasyonu sırasında G-C baz çiftinin A-T baz çiftine dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (McDorman ve ark. 2005). Bu lezyonun yaptığı yanlış eşleşmelerden 8-OH-Gua:C çiftinin etkili bir şekilde tamir edildiği fakat 8-OH-Gua:A çiftinde tamirin zayıf kaldığı gösterilmiştir (Le Page ve ark. 1998). Ayrıca, transkripsiyon ve replikasyonu etkilediği ve pek çok kanser türünde arttığı gözlenmektedir (Culp ve ark. 1989). Bu nedenlerle 8-OH-Gua ölçümü, DNA’daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif

DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır (Kumari ve ark. 2008).

## 2.5. DNA Onarım Mekanizmaları

DNA onarım sisteminde 100'den fazla gen rol oynar. Bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. DNA hasarı tamir edilmezse mutasyonlara ve genomik kararsızlığa yol açar. DNA onarım mekanizmaları genomik stabilitenin devamını sağlayan çok önemli bir sistemdir (Bütüner ve Kantarcı 2006).

Normal bir insan hücresinde replikasyon esnasında DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi ile meydana gelen hata oranı  $1.10^{-10}$ , hata okuma mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı ise  $1.10^{-8}$ 'dir (Bütüner ve Kantarcı 2006). DNA sentezi sırasında sağlamalı okuma ve yanlış yerleşimi onarma olmasına rağmen, bazı yanlış yerleşmiş bazlar kalmaktadır. Ayrıca, hücrelerde oluşan, solunum yoluyla veya çevresel mutajenlerle DNA hasara uğramaktadır. Normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştüren mutajenler, karsinojenler olarak adlandırılmaktadır.

Hücrelerin DNA hasarını onarabilme yetenekleri, hasarın tanınması ve onarılmasını kapsamaktadır. Onarım mekanizması olmadan yaşamın devam etmesi mümkün değildir. Çeşitli kimyasal maddeler ve radyasyonla etkileşim sonucu DNA hasarı oluşabilmektedir. X-ışını, hücrede DNA ile etkileşen molekülleri harekete geçirmekte, bazların yapısını değiştirmekte ve DNA zincirinde kırılmalara yol açmaktadır. DNA hasarı oluşmasına neden olan en önemli etkenlerden biri olan sigara dumanında bulunan karsinojenlerden aromatik polisiklik hidrokarbon yapısındaki benzo(a)pirendir. Benzo(a)piren, hücrede enzimler ile okside olarak, DNA yapısındaki guanine bağlanmaktadır. Güneş ışığının UV bileşeni de komşu pirimidin bazları arasında kovalent bağ oluşturarak dimer meydana gelmesine neden olmaktadır (Akçay 2006).

DNA'da meydana gelen hasarların onarılması için prokaryot ve ökaryot hücrelerde, baz kesip çıkarma ile onarım, nükleotid kesip çıkarma ile onarım, yanlış eşleşme onarımı (mismatch onarım) ve direkt onarım ve rekombinasyon/çapraz bağlanma olmak üzere



beş farklı onarım sistemi bulunmaktadır (Sancar ve ark. 2015). Bu mekanizmalar ve onarım yaptığı hasarlar Çizelge 2.5.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.5.1. DNA onarım mekanizmaları**

<b>DNA onarım mekanizması</b>	<b>Onarılan DNA hasarı</b>
Direkt onarım	Pirimidin dimerleri O <sup>6</sup> -metilguaninler
Baz kesip çıkarma onarımı	Okside olmuş bazlar Alkillenmiş bazlar
Nükleotid kesip çıkarma onarımı	Pirimidin dimerleri Okside olmuş bazlar Cisplatin katılma ürünleri
Yanlış eşleşme onarımı	Yanlış baz eşleşmeleri Katılma ve silinmeler
Rekombinasyon/çapraz bağlanma onarımı	Çift sarmal kırıkları Sarmallar arası çapraz bağlanmalar

### **2.5.1. Direkt onarım**

Sadece timin dimerleri ve alkillenmiş bazlara ilişkin hasarlar, direkt onarım mekanizması ile zincir kırılmadan onarılmaktadırlar.

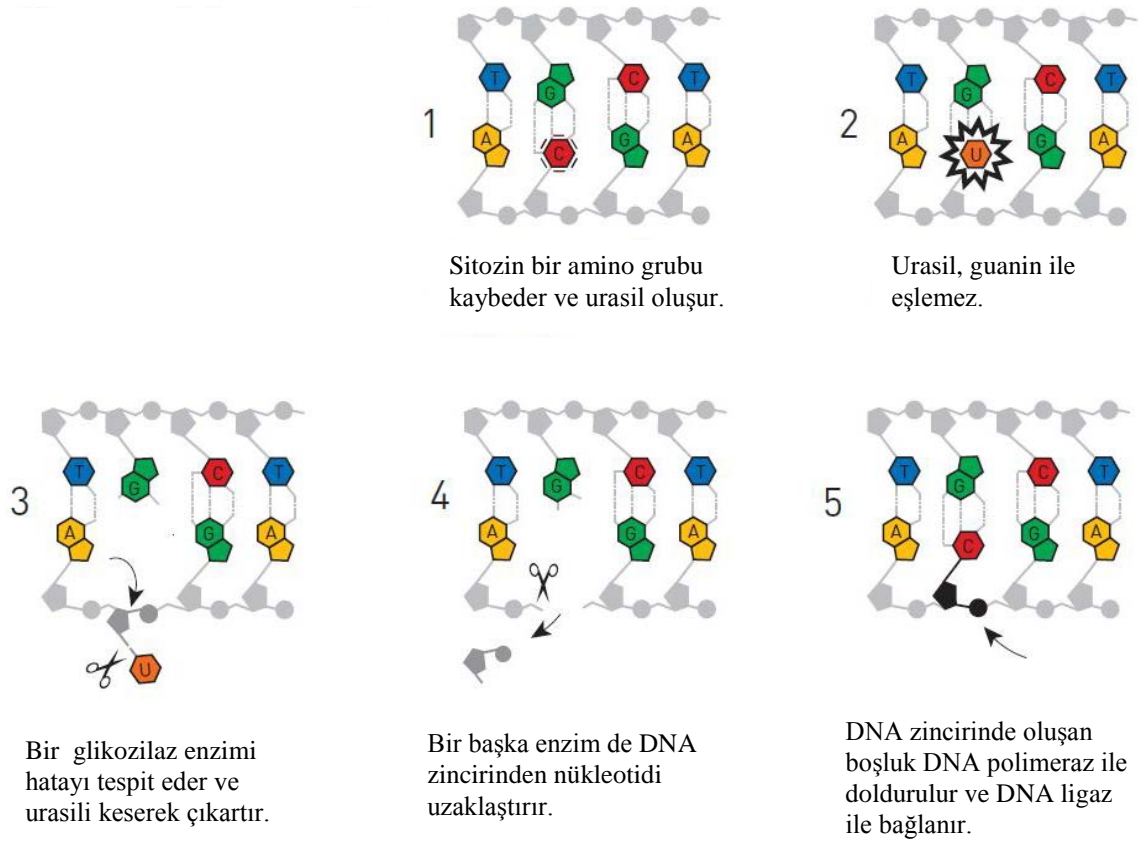
a) Fotoreaktivasyon: Tek ve çift sarmal DNA üzerinde bulunan timin dimerleri, dalga boyu 300-600 nm olan ışıkla uyarılan fotolizaz tarafından birbirinden ayrılmaktadır.

b) DNA alkilasyonunun onarımı: Alkilleyici maddelerin en fazla oluşturduğu hasar, guaninin metillenmesidir. DNA metiltransferaz enzimi guanindeki metil grubunu kendi üzerine aktararak bu hasarı onarmaktadır (Akçay 2006, Bütüner ve Kantarcı 2006).

### **2.5.2. Baz kesip çıkarma onarımı (BER)**

DNA molekülündeki bazlar çeşitli dış etkiler nedeniyle, oksidasyon, alkilleme veya deaminasyon yapan bileşiklerin etkisi ile değişikliğe uğrayabilmektedir. Hücrelerde

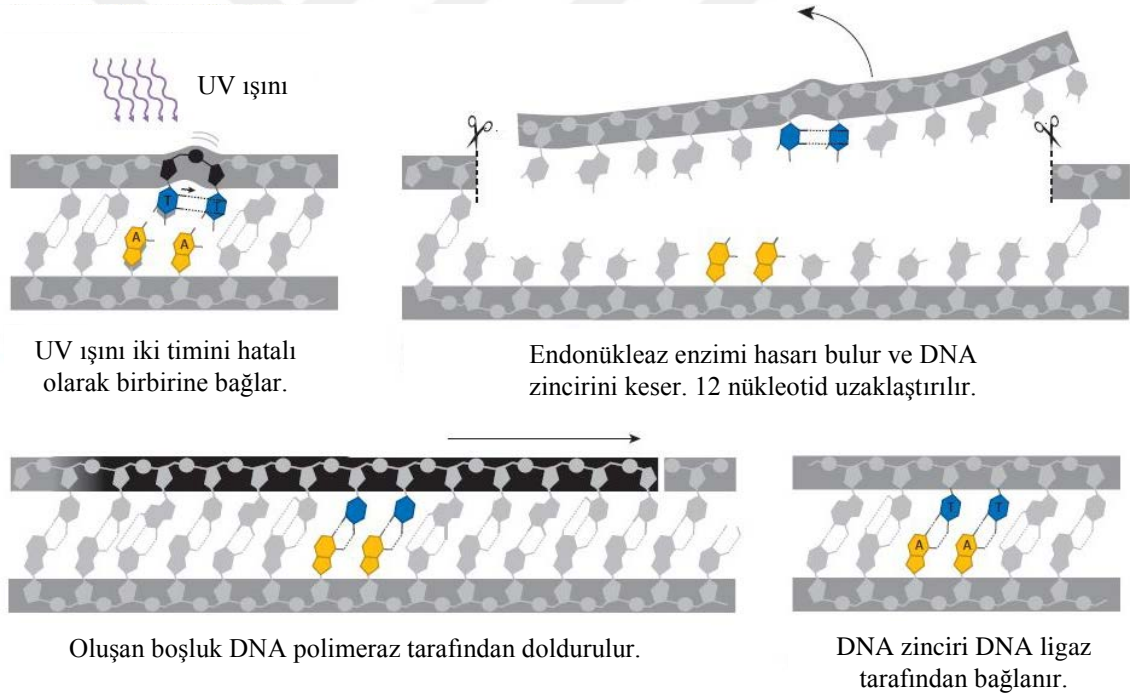
çeşitli öncül maddelerden oluşan nitroz asit, guanin, sitozin ve adeninden amino grubunu uzaklaştırmaktadır. Hücrede günde yaklaşık 10000 adet pürin yapısındaki baz kendiliğinden kaybolmaktadır. Baz değişimi veya kaybı ile oluşan hasarların düzeltilmesinde öncelikle, hasarlı bazlar spesifik DNA glikozilaz enzimleri tarafından DNA yapısından çıkartılırlar (Akçay 2006). Enzimin baz ile şeker arasındaki glikozidik bağı koparmasıyla apürinik/apirimidinik (AP) olarak tanımlanan bir bölge oluşur. AP endonükleazlar, apürinik/apirimidinik bölgeyi keserek, bu bölgeyi uzaklaştırırlar. Ortaya çıkan boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulup, DNA ligaz ile bağlanarak hasar onarılmaktadır (Şekil 2.5.2.1) (Tuteja ve ark. 2001, Bütüner ve Kantarcı 2006). Oksidatif stres, hidroliz, deaminasyon nedeniyle hasar görmüş olan bazları uzaklaştırmak için kullanılan bir onarım mekanizmasıdır (Boiteux ve Robertson 2013).



**Şekil 2.5.2.1.** Baz kesip çıkarma onarımı

### 2.5.3. Nükleotid kesip çıkarma onarımı (NER)

Hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde en çok kullanılan tamir mekanizmalarından biridir (Tuteja ve ark. 2001). Özellikle güneş ışığının etkisi ile oluşan komşu pirimidinlerin kovalent bağlanarak dimer oluşturması, DNA polimerazların çalışmasını ve DNA zincirinin replikasyonunu engellemektedir. Özel bir endonükleaz olan multifonksiyonel enzim Uvr ABC, hasar spesifik endonükleaz tarafından tanınan timin dimerlerinin zincirini iki ucundan kırmaktadır. Hasarlı bölgenin ayrılmasıyla oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulup, DNA ligaz ile bağlanarak hasar onarılmaktadır (Şekil 2.5.3.1.) (Akçay 2006, Bütüner ve Kantarcı 2006). DNA onarım mekanizmaları içinde sadece nükleotid kesip çıkarma onarımı doğrudan biyolojik saat ile kontrol edilmektedir (Sancar ve ark. 2015).

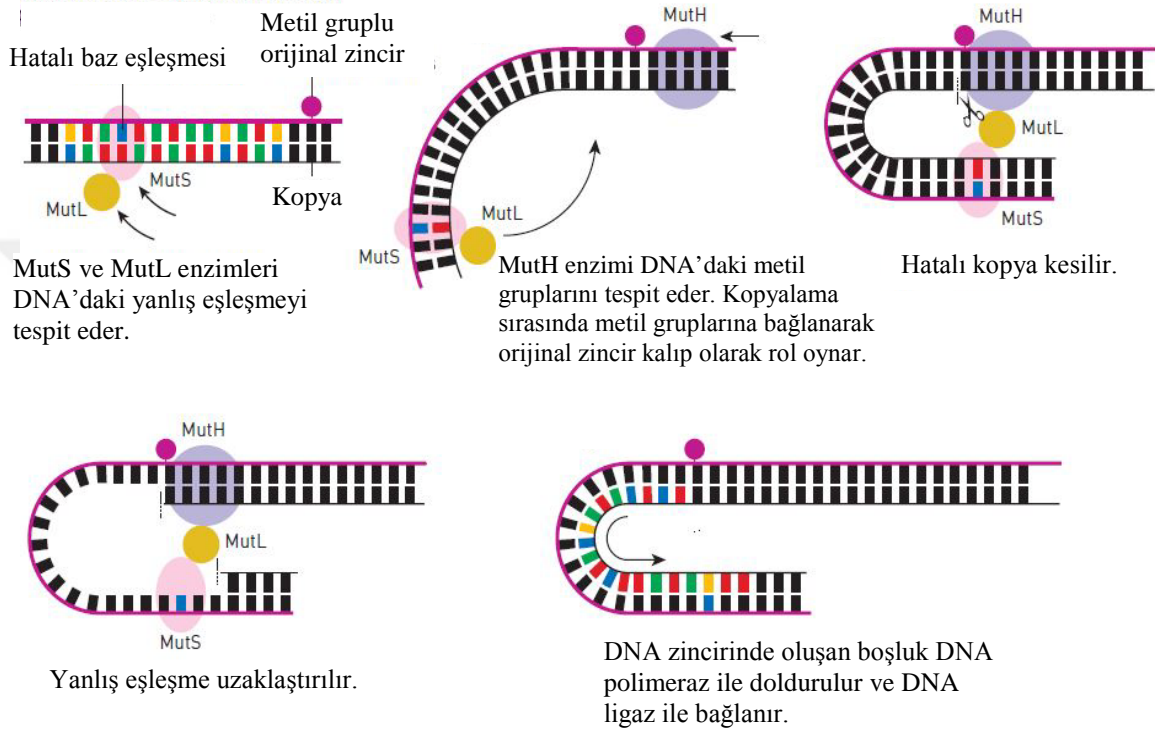


Şekil 2.5.3.1. Nükleotid kesip çıkarma onarımı

### 2.5.4. Yanlış eşleşme onarımı

Yanlış eşleşme onarımında normalde DNA molekülünde bulunan ama yanlış eşleşmiş olan bazlar değiştirilmektedir. En çok replikasyon hatası olarak görülen yanlış eşleşme,

rekombinasyon ve onarım işlemleri sırasında da olabilmektedir. Yanlış eşleşmiş olan baz MutS ve MutL gibi çeşitli proteinler yardımıyla tanınır, kesilerek DNA kıvrımı açılmakta ve yıkıma uğramaktadır. Oluşan boşluk DNA polimeraz ile doldurulduktan sonra zincir bağlanarak hasar onarılmaktadır (Şekil 2.5.4.1.) (Mu ve ark. 1997, Akçay 2006, Bütüner ve Kantarcı 2006).



**Şekil 2.5.4.1.** Yanlış eşleşme onarımı

### 2.5.5. Rekombinasyon/çapraz bağlanma onarımı

Rekombinasyon onarımı, DNA'nın replikasyonundan sonra aktif olan bir mekanizmadır. Hasar bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce bu hasarda duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlayarak senteze devam eder. RecA proteini, rekombinasyonel bir değiş tokuş ile hasarsız bileşenleri transfer eder. Doğru şekilde tamamlanan DNA zincirinde oluşan boşluk DNA polimeraz-ligaz enzimleri sayesinde doldurulur (Noll ve ark. 2006).

## **2.6. Kanser Oluşumunda DNA Hasarının Rolü**

Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir (Neri ve ark. 2006). Kanser oluşumunun temelinde daima genetik bir hasarlanma yatmaktadır. Bu hasarlanma kalıtsal olacağı gibi çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle sonradan da olabilir. Hücre büyümesini destekleyen protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler ve apoptozu denetleyen genler bu hasar oluşumunun başlıca hedefleri arasındadır. Ayrıca DNA hasarının onarımından sorumlu genler de kanser oluşumunda hedef genler arasında bulunmaktadır (Aslan 2006).

### **2.6.1. Onkogenler**

Hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde etkili olan genlerdir. Normal şartlarda, genetik değişimlerin gözlenmediği durumlarda bu yapılara proto-onkogenler adı verilir. Normal koşullarda hücre transformasyonu oluşturmayan protoonkogenler delesyonlar, eklentiler, nokta mutasyonları ve translokasyonlar gibi genetik değişimler ile aktive olarak onkogen haline dönüşmektedirler. Onkogenler normal hücrelerin malign hücrelere transformasyonlarını başlatmakta ve sürdürmektedirler. Normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde işlev gören proteinleri sentezleyebilen onkogenler, malign hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır. Dominant karakterdedirler, kromozom çiftlerinden bir tanesinin içermesi, onkogenlerin aktivasyonu için yeterlidir (Pierotti ve ark. 2004, Aslan 2006).

### **2.6.2. Tümör baskılayıcı genler**

Hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamirinin hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genetik yapının değişmemesini sağlayarak gösterirler. Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin (anti-onkogenler) birinde veya

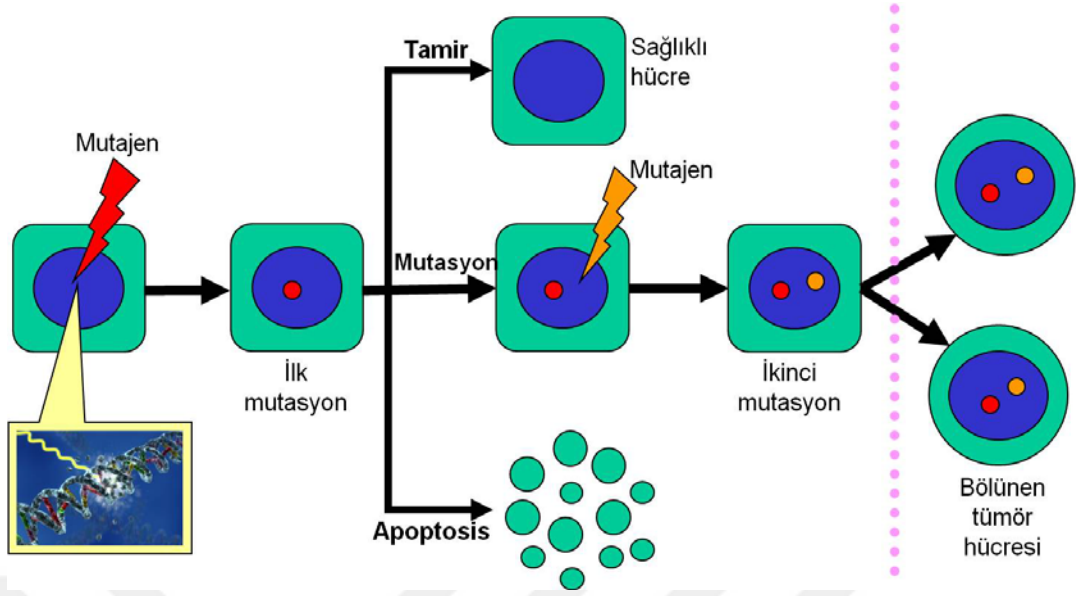
birkaçındaki mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır. Mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genlere bağlı kontrolsüz hücre büyümesi genetik olarak resesiftir ve etkili olması için her iki kromozom çifti de bu geni içermelidir. pRb, p53, p21 genlerinin her iki kopyasında da bulunan mutasyonun normal hücre büyümesini baskılanmasını engellemesi sonucu tümör oluşmaktadır (Aslan 2006, Masthan ve ark. 2014, Anonim 2015).

### **2.6.3. DNA onarım genleri**

DNA onarım genleri hücre bölünmesi öncesi DNA kendisini eşlerken olan hataları onaran bir grup proteini kontrol eden genlerdir. DNA onarım mekanizmalarında çok sayıda gen rol almaktadır. Bu genlerin ürünü olan proteinler onarım mekanizmalarında görev yaparlar. Çeşitli çevresel etkilerin yanı sıra normal koşullarda bölünmekte olan hücrede replikasyon sırasında DNA'da oluşan hasarların hemen onarılamaması halinde hücre neoplastik transformasyona uğramaktadır. DNA onarım genlerindeki bozukluklar, DNA'da oluşan hasarların onarılamamasına neden olur. Hasarların onarılamaması da pek çok hastalığın oluşmasına neden olur. DNA onarım genlerinde kalıtsal mutasyon bulunanlarda kanser gelişim riski bulunmaktadır (Friedberg 2003, Aslan 2006).

### **2.6.4. DNA hasarı - kanser ilişkisi**

Genellikle bir hücrenin kanser hücrelerine tam olarak dönüşebilmesi için birden fazla genetik mutasyonun gerçekleşmesi gerekmektedir (Şekil 2.6.4.1.). Tümör baskılayıcı genlerin mutasyon sonucu inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, birçok kanser türünün gelişimi ile bağlantılıdır. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişki, hem karakteristik mutasyonlara neden olan kimyasal maddelere maruz kalma sonucu gelişen kanserlerle, hem de DNA onarım hataları sonucu artan kanser riski ile anlaşılabilir. Mutajenite, kanser gelişiminin hem başlangıç, hem de gelişme evresinde rol oynar (Croteau ve Bohr 1997, Bütüner ve Kantarcı 2006, Robin ve ark. 2015).



**Şekil 2.6.4.1.** DNA hasarı ile kanser oluşumunun şematik gösterimi

Genetik kararsızlık kanserin karakteristik özelliğidir. Kanserler, genetik kararsızlığa neden olan bir mutasyon oluşuktan sonra, bu mutasyonların çoğalması ile oluşur. Normal hücreden kanserli bir hücreye geçişte, hücre yaşamının düzenlenmesi, apoptozis, hücre farklılaşması ve diğer birçok hücre fonksiyonunu etkileyen spesifik mutasyonlar gereklidir. Kanser, yalnızca bir hücrede birçok farklı gende mutasyon olursa ortaya çıkar. Bu mutasyonlar genomun bütünlüğünü sağlayan genlerde veya tümör gelişimi süresince hücrelerde meydana gelebilir. Bu değişiklikler, tek bir nükleotitte, küçük DNA bölümlerinde, genin tümünde, kromozomun yapısal bileşenlerinde ya da kromozomun tümünde gerçekleşebilir (Croteau ve Bohr 1997, Dianzani ve ark. 2006, Robin ve ark. 2015).

Örneğin, kalıtsal non-polipozal kolorektal kanser, hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluktan, kolorektal kanser ise baz çıkarma onarımındaki bir bozukluktan kaynaklanır. Nükleotid çıkarma onarımı mekanizmasındaki bozukluklar, güneşe duyarlılığa ve UV kaynaklı cilt kanseri riskinde artışa neden olur. Meme kanseri, iyonize radyasyona maruz kalma ile ilişkilidir. Malign prostat kanserli hücrelerde, DNA onarım genlerinin ekspresyonuyla fonksiyonu arasındaki farklılığın varlığı, prostat tümörü gelişiminde, hatalı DNA onarımının rolü olduğunu düşündürmektedir. DNA

metilasyonu, prostat kanseri başlangıcında genetik bir faktör olarak kritik rol oynar (Digweed 2003, Baglioni, 2004, Fan ve ark. 2004, Sieber ve ark. 2005).

Tümör gelişiminde kararsız genomun rolünün en iyi göstergelerinden biri, sporadik kolon ve endometrium kanserlerinin %10-15'inin nedeni, DNA hatalı eşleşme onarımının görevini yapmamasıdır. Hatalı eşleşme onarımının eksik olduğu kanserlerin çoğunlukla kalıtsal olması, çok fazla genomik kararsızlığın hücre için bir dezavantaj olduğunu göstermektedir (Sieber ve ark. 2005).

Birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilir ve böylece tedaviye cevabın azalmasına neden olur. İyonize radyasyon ve birçok anti-kanser ilaç, DNA hasarının en toksik şekli olarak düşünülen DNA çift zincir kırıklarının oluşmasına yardımcı olur. Bu kırıkların onarımı hücrenin genomik kararlılığı sürdürmesinde ve hayatta kalmasında kritik rol oynar. Birçok araştırmacı, kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını düşürmek için çift zincir kırıklarının onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönündeki tedavi şeklini kullanmaktadır (Belzile ve ark. 2006).

Tüm kanser türlerindeki ortak özellik kontrolsüz hücre bölünmesidir. Erişkin bir insanda her gün yaklaşık 350 milyar hücre bölünmesi gerçekleşmektedir. Bu bölünmelerden birinde büyüme durdurucu sinyallere cevap vermeyen bir hücre ortaya çıktığında kanser başlayabilir. DNA onarımındaki bozukluklar, akciğer, meme, kolon ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu gibi, büyüme ve beyin anomalilerine de sebep olur (Giles ve ark. 1997, Kryston ve ark 2011).

Tüm kanserler, DNA'da meydana gelen anormallikler nedeniyle oluşmaktadır. Kanserlerin % 10-15'inin, kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan % 85-90'lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser hücresinin oluşmasını sağlar. Kansere sebep olan etmen ne olursa olsun, sonuçta



hücresinin genetik malzemesinde bozulma meydana gelir. Tek bir gendeki mutasyondan çok, farklı genlerde oluşan hasar kanser oluşumunda rol oynamaktadır (Williams 2001, Yokuş ve Çakır 2012).

## 2.7. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

Son yıllarda DNA’da meydana gelen oksidatif baz hasarını belirlemek amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Bu amaçla, immünokimyasal teknikler, tek hücre jel elektroforezi (comet testi), DNA onarım enzimleri kullanarak alkalın elüsyon, yüksek performanslı sıvı kromatografi-elektrokimyasal dedektör (HPLC/ECD), yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC/MS, LC/MS/MS) ve gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC/MS) gibi teknikler kullanılmaktadır (Dizdaroğlu ve ark. 2002). GC/MS ve LC/MS teknikleri kullanılarak tayin edilebilecek oksidatif DNA hasar ürünlerinin sınıfları Çizelge 2.7.1.’de görülmektedir (Dizdaroğlu 2012c).

**Çizelge 2.7.1.** Oksidatif DNA hasar ürünlerini ölçüm teknikleri

GC/MS	LC/MS
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Modifiye bazlar</li><li>2. Modifiye nükleozidler</li><li>3. 8,5'-Siklopurin-2'-deoksinukleozidler (Baz-şeker kovalent bağlanması)</li><li>4. Modifiye şekerler</li><li>5. DNA-protein çapraz bağlanması</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Modifiye nükleozidler</li><li>2. 8,5'-Siklopurin-2'-deoksinukleozidler (Baz-şeker kovalent bağlanması)</li></ol>

Genellikle kütle spektrometri içermeyen teknikler, farklı DNA hasar ürünleri arasından tek bir tanesinin tayini için kullanılmaktadırlar ve bu tekniklerle molekül hakkında yapısal bir bilgi elde edilemez. En çok kullanılan tekniklerden biri HPLC/ECD’dir. Bu teknikle DNA’nın enzimatik hidrolizi sonrası nükleozid yapıdaki 8-OH-Gua veya 8-OH-dG tayin edilir. Çünkü bu teknik mutajenik özelliği bilinen 8-OHdG tayinine

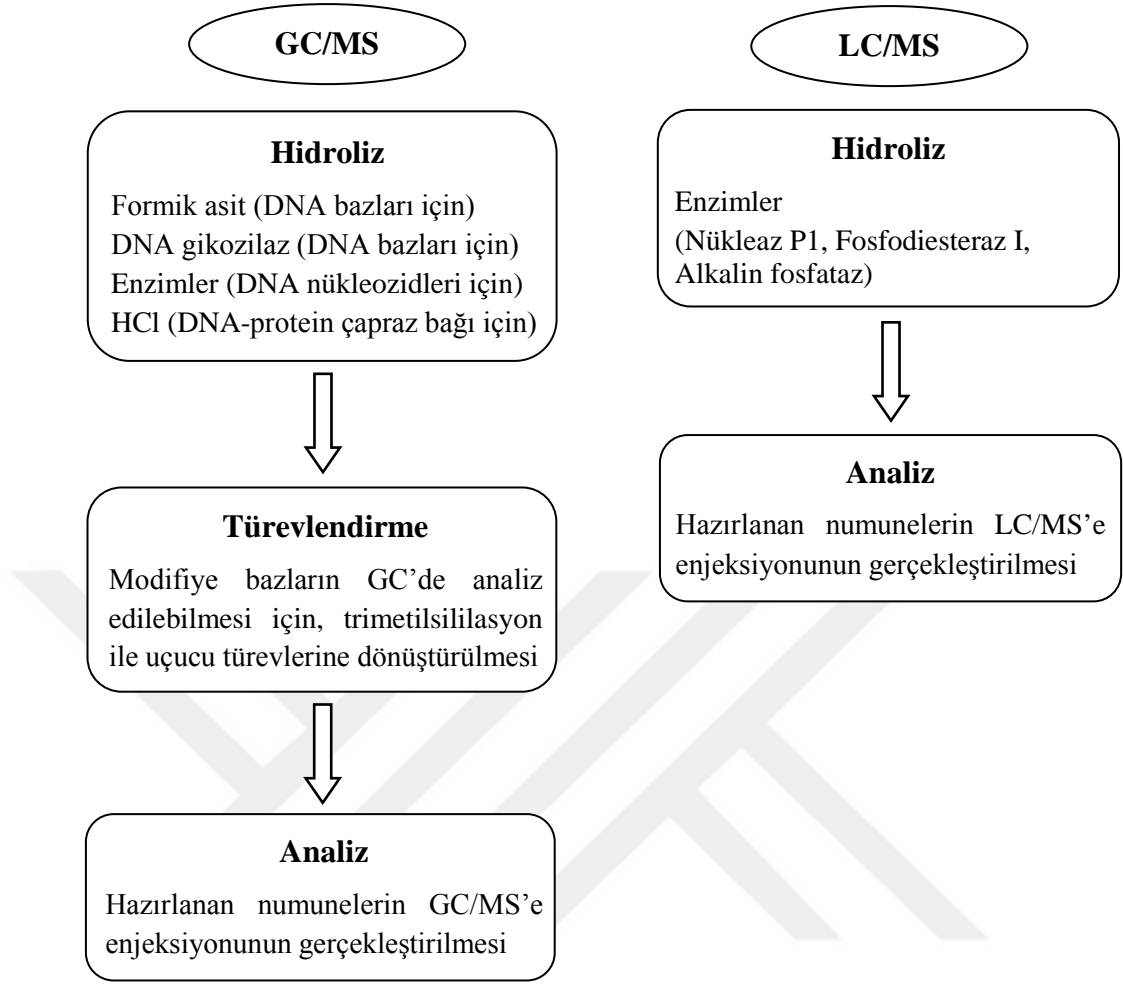
uygundur. Bu yöntem ile 8-OHdG 20 fmol'e kadar ölçülebilmektedir. Ancak, biyomarkör olarak tek bir molekülün tayini yanıltıcı olabilir. Tek bir hasar ürününün tayini oluşan DNA hasarının genel oranını yansıtmayabilir (Dizdaroğlu ve ark. 2002, Jaruga ve ark. 2008).

Oksidasyon sonucu ortaya çıkan DNA baz hasarlarının ölçümünde yaygın olarak kullanılan diğer bir kromatografik teknik GC/MS'tir. Şimdiye kadar kullanılan ölçümler içerisinde GC/MS, in vitro ya da hasara uğramış DNA'da dört bazda da oluşan hasar ürünlerinin belirlenmesine olanak sağlayan tek tekniktir (Yokuş ve Çakır 2012). Ayrıca GC/MS, DNA onarım enzimlerinin kesip çıkarma onarımı kinetiğini ve hücrel DNA onarım düzeyini ölçmede kullanılabilir. GC/MS tekniği, oluşan tüm baz ürünlerinin karakterizasyonunda kullanılmıştır. GC/MS ile analizde öncelikle DNA, sağlam ve modifiye bazları elde etmek için asitle hidrolize edilmeli veya sağlam ve modifiye nükleozidleri elde etmek için endo ve ekzo nükleazlarla muamele edilmelidir. Asidik hidroliz yerine *Escherichia coli* Fpg proteini (formamidopirimidin glikozilaz) ve *Escherichia coli* Nth proteini (endonükleaz III) gibi onarım enzimleri de kullanılabilir. Hidroliz aşamasında DNA onarım enzimlerinin kullanılmasının avantajı ise asidik hidrolize nazaran ortama hiçbir sağlam bazın salınmamasıdır. Elde edilen hidrolizatlar BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid) kullanılarak türevlendirilir. Böylece uçucu formlarına dönüştürülen hasar ürünleri gaz kromatografisi ile ayrılır ve kütle spektrometresi ile dedekte edilir. GC/MS tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda ısıtma işlemiyle DNA iskeletinin sadece fosfodiester bağları değil, baz-şeker bağları da hidroliz olur ve 8-OH-G oluşur. Ayrıca gaz kromatografik yöntemde, DNA baz hasar ürünlerinin gaz fazına geçebilmeleri için klasik olarak kullanılan trimetilsilyasyon ile türevlendirme basamağındaki ısıtma işlemi sırasında oksidatif hasar oluşabileceğinden, hatalı sonuçlar alınabilmektedir. Bunu en aza indirmek için türevlendirme işlemi azot gazı ortamında yapılmalıdır (Dizdaroğlu ve ark. 2002).

GC/MS ile seçilmiş iyon taraması (selected-ion monitoring, SIM) modunda DNA hasar ürünlerini düşük konsantrasyonlarda tayin etmek mümkündür. Bu teknik ile 5 fmol'dan daha düşük miktarlarda 8-OHdG düzeyi ve 1 fmol civarında FapyAde ile FapyGua miktarları belirlenebilmektedir (Dizdaroğlu ve ark. 2002, Jaruga ve ark. 2008). GC/MS

ve LC/MS ile 8-OHdG ölçümünün karşılaştırılmasında, GC/MS'in daha hassas olduğu belirtilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda DNA ekstraksiyon şartlarının modifiye olmayan bazların yapay oksidasyonuna sebep olarak hatalı sonuçlara neden olabileceği gösterilmiştir. DNA ekstraksiyonu sırasında fenol kullanımının yapay oksidasyona neden olduğu, kontaminasyon durumunda ölçümde kullanılan DNA miktarının az olmasının hata yüzdesini arttırabileceği, DNA'nın enzimatik hidrolizinde inkübasyon süresinin ve enzim miktarının deoksinükleozid hidrolizini değiştirerek farklı sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir (Yokuş ve Çakır 2012).

LC/MS kullanım alanı GC/MS'e göre daha sınırlıdır. LC/MS tekniği ile GC/MS'de ölçülebilen modifiye bazlar, modifiye şekerler ve DNA-protein çapraz bağlanması ölçülememektedir. Örnek hazırlama işleminde türevlendirme basamağına gerek duyulmaması yöntemin avantajıdır (Dizdaroğlu 2012c) Şekil 2.7.1.'de GC/MS ve LC/MS için örnek hazırlama basamakları görülmektedir.



**Şekil 2.7.1.** GC/MS ve LC/MS için örnek hazırlama basamakları

Kantitatif tayin yapmak için, analiz edilmek istenen oksidatif hasar ürünlerinin standartlarından çeşitli konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltilerin kromatografi cihazlarına enjeksiyonu yapılır. Elde edilen piklerin alanları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği oluşturulur. Kantitatif tayin yapılmak istenen maddenin kromatogramından elde edilen pik alanı kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak, miktar tayini yapılır. Ancak, örnek hazırlama işlemlerinden gelebilecek hataları en aza indirmek ve olası benzer maddeleri tam olarak tanımlayabilmek için, izotop seyreltme yöntemini kullanmak daha uygundur (Dizdaroğlu 2012c). Bu yöntemde analiz edilmek istenen maddenin yapısındaki azot-14 atomları yerine azot-15 atomları yerleştirilmiş olan stabil izotop işaretli iç standart kullanılır. Örneğin 8-OHdG molekülünün molekül kütlesi 283 g/mol iken, 8-OHdG-<sup>15</sup>N

molekülünün molekül kütlesi 288 g/mol'dür. Her iki molekülün de kimyasal ve fiziksel özellikleri aynı olmasına rağmen, <sup>15</sup>N içeren molekülün kütlesi içerdiği azot atomu sayısı kadar fazladır. Bu nedenle kromatogramda aynı alıkonma zamanına sahiptirler. Ancak, kütle spektrumları birbirinden farklıdır. SIM moda çalışıldığında her moleküle ait pik alanı ayrı ayrı elde edilebilir. İç standart ile bilinmeyen numunenin pik alanları oranlanarak konsantrasyonu bilinmeyen numunenin konsantrasyonu belirlenebilir. İç standart ortama örnek hazırlama işlemlerinin başında eklendiği için, analizi yapılmak istenen numune ile aynı aşamalardan geçmektedir. Bu sayede örnek hazırlama kısmından gelebilecek hatalar en aza indirilmiş olur.

## **2.8. Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı bir hastalıktır. Bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları ile (metastaz) sonuçlanabilir. Ölüm oranı oldukça yüksek olan akciğer kanserinin ortaya çıkmasından sigara kullanımı, genetik faktörler (Hackshaw ve ark. 1997, Gorlova ve ark. 2007), radon gazı (Catelinois ve ark. 2006), asbest (O'Reilly ve ark. 2007) ve hava kirliliği (Coyle ve ark. 2006, Kabir ve ark. 2007) gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır. Akciğer kanserinin görülme oranı yaşla artar, genellikle 50-70 yaşlarında görülür (Bozkurt ve ark. 2004).

### **2.8.1. Akciğer kanseri oluşumu**

Solunum yolları mukozasının karsinojen etkenlerle uzun süre karşılaşması sonucunda dokularda bir takım değişiklikler olur. Karsinojenler hücre içinde protein, lipid gibi birçok moleküle ve DNA'ya bağlanır. Kronik karsinojen maruziyeti DNA'da hasarlar oluşur. Bu hasar hücre çoğalmasından sorumlu, c-myc, ras gibi onkogenlerin aktivasyonu ve hücre büyümesini baskılayan Rb, p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açabilir (Keskin 2010).

Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki hasar, kanser oluşumundaki temel unsurdur (Göksel ve ark. 2010). Son yıllarda proto-onkogen olarak adlandırılan, normal ve

genellikle hücrenin bölünmesi ile ilgili işlevlerde rol alan genlerin; belirli karsinojenlerle onkogen haline geçerek, kanser oluşumunda rol oynadıkları anlaşılmıştır (Keskin 2010). Küçük hücreli akciğer kanserinde genellikle c-myc ve Rb; küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ise genelde ras ve p16 genlerinde sorun vardır.

Akciğer kanseri ile ilgili etkinleşmiş onkogenlerin 6 familyası vardır. En önemlileri ras (H-ras, K-ras, N-ras) ve myc (N-myc, C-myc, L-myc) dir (Keskin 2010). K-ras proto-onkogenindeki mutasyonlar akciğer adenokarsinomlarının %10-30'undan sorumludur (Aviel-Ronen ve ark. 2006, Herbst ve ark. 2008).

Hücrelerin çoğalma, apoptoz, damar gelişimi ve tümör gelişiminde rol alan epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörünü kodlayan ERBB1 geni ve RAS protoonkogenleri daha çok küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularında izlenen mutasyonlardan sorumludur (Göksel ve ark. 2010).

İnsan kanserlerinde en sık bulunan tümör baskılayıcı gen, kromozom 17'de bulunan p53 ve kromozom 13'te bulunan Rb genidir. Rb geni, büyümeyi kontrol eder. p53 genindeki mutasyonlar büyümeyi hızlandırarak kanser oluşumunda rol oynar. Akciğer kanserli hastaların büyük bir kısmında bu mutasyonlar gözlemlenmektedir (Keskin 2010). Baskılayıcı genler içinde en fazla araştırılanı p53 geni mutasyonlarıdır. Bir nükleer fosfoprotein olan p53, özellikle DNA hasarına cevap olarak hücre döngüsünü, DNA sentezi ve onarımını, hücre farklılaşmasını ve apoptozisi kontrol eden genleri düzenler. p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonları akciğer kanseri vakalarının ise %60-75'inde görülür. 3p, 5q, 13q, ve 17p konumlarında meydana gelen kromozom hasarları, bilhase küçük hücreli akciğer kanserleri olmak üzere akciğer kanserlerinde görülür (Kijima ve ark. 2003). Küçük hücreli akciğer kanseri olgularının %90'ında ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının ise %50'sinden fazlasında, 17p konumunda mutasyonlar bulunmuştur (Göksel ve ark. 2010).

### **2.8.2. Dünya’da ve Türkiye’de akciğer kanseri**

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (Beaglehole ve ark. 2004). Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılında 12,4 milyon yeni kanser vakası, 7,6 milyon kanser nedenli ölüm olduğunu tahmin etmektedir. Bunun 1,37 milyonunu akciğer kanseri hastaları oluşturmaktadır (Boyle ve Levin 2008). Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği Türkiye’de her yıl yaklaşık 200 000 kişiye kanser teşhisi konulduğunu, akciğer, meme ve kolon kanserinin en sık görülen kanser türleri olduğunu belirtmektedir (Anonim 2016a). Türkiye’nin Akciğer Kanseri Haritası Projesi’nden alınan verilere göre akciğer kanseri erkeklerde 100 000’de 75, kadınlarda 100 000’de 10 olup, yıllık beklenen yeni hasta sayısı yaklaşık 30 000’dir. Türkiye, akciğer kanseri görülme oranı en yüksek ülkelerden biridir (Göksel ve ark. 2010, Anonim 2016b).

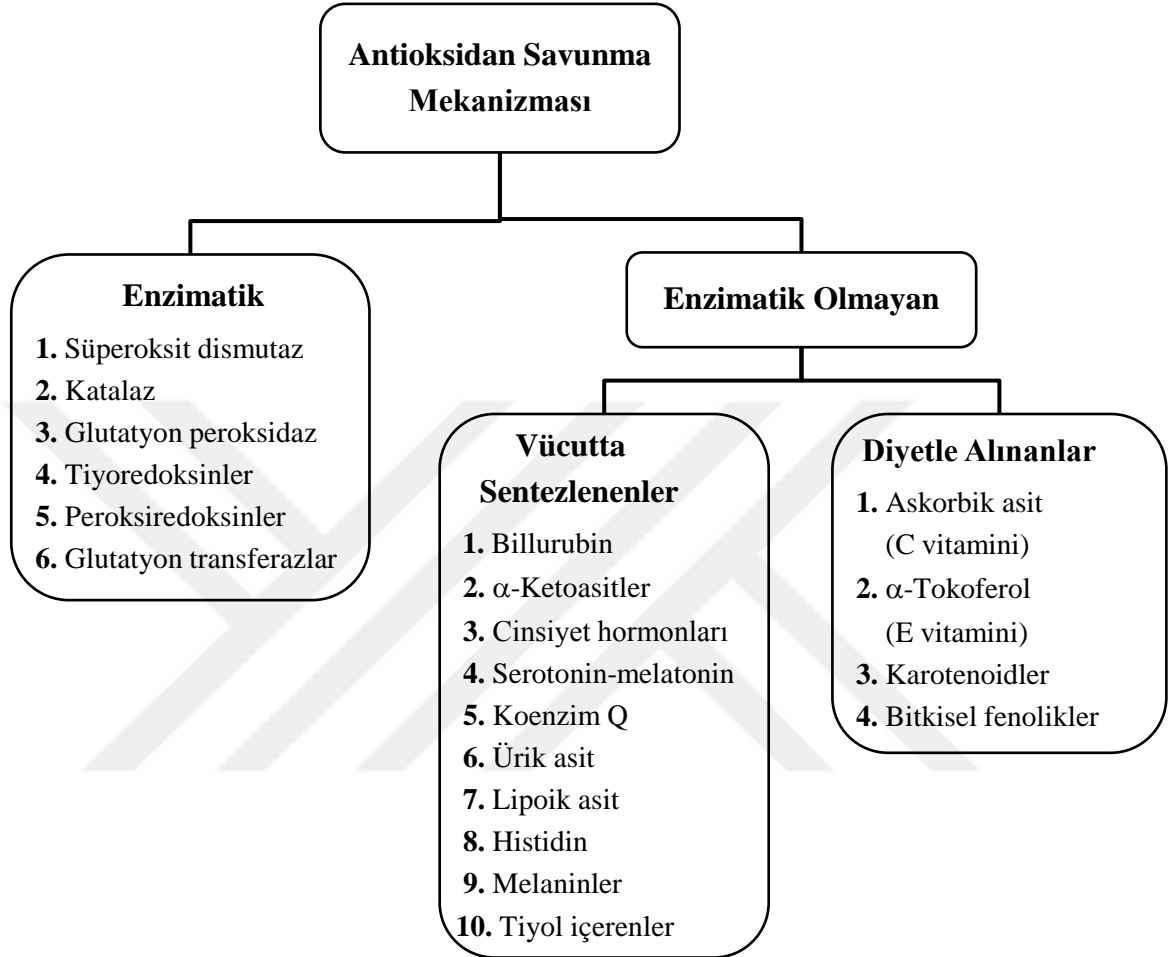
Akciğer kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler için önemli bir ölüm nedenidir. Dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olup, tüm kanser ölümlerinin %19,4’ünden sorumludur. Bu sayı her yıl meme, kolon ve prostat kanserinden dolayı kaybedilen hasta sayısı toplamından daha fazladır (Anonim 2016b).

### **2.9. Antioksidan savunma**

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve etkisiz hale getirme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Gülçin 2012). Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Şekil 2.9.1’de gösterildiği gibi antioksidan savunma mekanizması, enzimatik olan ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye ayrılır (Birben ve ark. 2012).

Enzimler, oksidanları tutarak daha etkisiz bir moleküle dönüştürmektedirler. Vitaminler ve fenolik bileşikler, oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirebilmektedir.

Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini, oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellemektedirler (Sözmen 2006).



**Şekil 2.9.1.** Antioksidan savunma mekanizmasının şematik gösterimi

### 2.9.1. Enzimatik antioksidan savunma sistemleri

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Ökaryotik hücrelerin sitozol ve mitokondri membranları aralığında bulunan ve molekül kütlesi 31,2 kDa olan enzim, her bir dimerik protein için birer molekül bakır ve çinko içeren ya da tetramerik Mn içeren izomer yapısındadır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücrelerde süperoksit düzeyini düşük tutmak ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. (Sözmen 2006, Valko ve ark 2006).



Katalaz enzimi düşük hızda  $H_2O_2$  oluşan durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif,  $H_2O_2$  oluşum hızının arttığı durumlarda ise hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırmaktadır. Hidroksil radikali oluşumunu hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak engeller. Molekül kütlesi 248 kDa olan katalaz, kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Sözmen 2006, Valko ve ark 2006).

Glutasyon peroksidaz enzimi, glutasyon ile hidrojen peroksit veya lipid peroksidlerinin indirgenmesinde; glutasyon redüktaz ise glutatyonda oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesinde görev yapmaktadır (Sözmen 2006). Diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan glutasyon peroksidazdır (Özel ve Birdane 2014).

Tiyoredoksinler tiyol grubu içeren enzimlerdir. İnsan hücrelerinde sitoplazmada ve mitokondride bulunurlar. Bu enzimlerin en önemli fonksiyonu tiyoredoksin proteininin NADPH'ya bağımlı olarak indirgenmesini katalizlemektir. Bu reaksiyonda elektronlar NADPH'dan enzimin substratı olan tiyoredoksine geçerek substratı indirger. Tiyoredoksinler 10-12 kDa'luk bir protein ailesidir. Bu proteinlerin iki sistein grubu geri dönüşümlü yükseltgenme-indirgenmeye uğrar (Gromer ve ark. 2004, Birben ve ark. 2012).

Peroksiredoksinler, sistein kalıntılarının hidrojen peroksidi indirgemesinde kullanılan peroksidaz enzim grubuna aittir. İnsan hücrelerinde 6 farklı peroksiredoksin bulunmaktadır. Peroksiredoksinlerin en önemli görevi, organik hidroperoksit (ROOH), peroksinitrit ve hidrojen peroksitlerin toksik etkisini azaltarak veya inhibe ederek antioksidatif etki göstermektir (Dubuisson ve ark. 2004, Birben ve ark. 2012).

Glutasyon transferazlar, dimerik yapıda enzimlerdir. Mutajen, karsinojen ve diğer zararlı kimyasal maddelerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde rollerinin oynarlar. Ayrıca metabolize edilemeyen hidrofilik-lipofilik pek çok bileşiği ve ksenobiotikleri

bağlayarak, hücre içinde bağlayıcı ve taşıyıcı olarak da görev yaptıkları belirlenmiştir. (Aköz ve ark. 2000, Ladner ve ark. 2004).

### 2.9.2. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri

Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri, vücutta sentezlenenler ve diyetle alınanlar olmak üzere ikiye ayrılır. Vücutta sentezlenebilen antioksidanlar ve yaptıkları görevler Çizelge 2.9.2.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.9.2.1.** Vücutta sentezlenebilen antioksidanlar ve işlevleri

Antioksidan	İşlev
Billurubin	Peroksil radikali ve singlet oksijeni yok etmektedir.
$\alpha$ -Ketoasitler	Piruvat ve $\alpha$ -ketoglutarat $H_2O_2$ ile enzimatik olmayan tepkimeye girmektedir.
Cinsiyet hormonları	Dişi cinsiyet hormonları lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir.
Serotonin-melatonin	Antioksidan enzim sentezini uyarmaktadırlar.
Koenzim Q	Serbest radikal tutucudur.
Ürik asit	$O_2^{\bullet-}$ , $\bullet OH$ radikalleri tutucusu
Lipoik asit	Serbest radikaller, özellikle $\bullet OH$ radikalini etkisizleştirir.
Histidin	Bakır iyonlarını şelatlayan karnozin, homokarnizon ve anserin lipit peroksdasonunu önlemektedir.
Melaninler	Yapılarındaki eşleşmemiş elektronlar ile UV ışının absorbe edilmesini sağlarlar.
Tiyol içerenler	Serbest radikal ve HOCl tutucudur.

Diyetle alınan antioksidanlardan E vitamini ve analogları, lipid peroksidasyon ürünlerini tutarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını durdurarak reaktif oksijen radikallerini inaktive eder (Bader ve ark. 2006). Süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil ( $\bullet OH$ ) radikallerini tutucu olan C vitamini, E vitaminini de rejenere eder. Süperoksit, hidroksil, singlet oksijen, hidroperoksil, lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları

ortamdan temizler. Lipid moleküllerinin oksidasyonu ile oluşan lipid peroksitler; vitamin C'nin antioksidan etkisiyle sulu ortamda çözülerek oksidan etkilerini kaybederler (Kudlackova ve ark. 2006). Karotenoidler; hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri ile etkileşime girerek radikal süpürücüsü olarak iş görür. Yapılarındaki çift bağların yerleşik olmayan eşleşmemiş elektronlara bağlanması sonucu antioksidan aktivite gösterirler. Yüksek konsantrasyonlarda, lipidleri peroksidasyondan korurlar. Serbest radikaller ile karotenoidler arasındaki ilişkide temel olarak üç mekanizma göze çarpar. Serbest radikallere yeni bir radikal ekleme, yapısından bir hidrojen kopararak radikali etkisiz hale getirme ve yapısından bir elektron transfer ederek radikali yüksüzleştirme şeklindedir (Lobo ve ark. 2010).

Diyetle alınan bitkisel kaynaklı antioksidanlar, flavanoller ve fenolik asitler olarak iki grupta toplanabilir. Pek çok fenolik bileşik diyetle vücuda alınmaktadır. Flavanollerin ve fenolik asitlerin bitkilerde en önemli işlevi, bitkinin savunma mekanizmasındaki aktif görevleridir. Bitkinin aşırı UV ışığına maruz kalması, zarar görmesi (yaralanma) gibi durumlar fenolik bileşiklerin biyosentezine neden olmaktadır. Bu nedenle çevresel koşullar bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik asitlerin miktarını büyük ölçüde etkilemektedir. Fenolik bileşikler bitkilerdeki hastalık direnç mekanizmasına da katkıda bulunurlar. (Bennet ve Wallsgrove 1994). Bu nedenle antioksidan özellikte maddeleri içeren gıdaların tüketilmesi sağlık açısından da oldukça önemlidir. Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman patolojik koşullar oluşabilmektedir (Kasnak ve Palamutoğlu 2015).

## **2.10. Bitkisel Antioksidan Kaynağı Olarak Kekik**

Kekik, çeşitli kimyasal ve aromatik özelliklerinden dolayı, tarımda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde, besin maddelerini kokulandırmada, parfümeride ve baharatların yapımında büyük ölçüde kullanılır. Ayrıca kekik önemli bir kokulu bitki olup, Dünya mutfağında ve özellikle Akdeniz mutfağında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda bozulmaya ve gıda zehirlenmelerine yol açan bakteriler

üzerindeki antibakteriyel etkisi nedeniyle son yıllarda fazlaca kullanılan bir baharat bitkisidir (Kılıç ve Bağcı 2008).

### 2.10.1. Türkiye’de kekik

*Origanum vulgare* L. çok yıllık, sık tüylü, beyaz veya pembe çiçekli, kuvvetli kokulu, 50-80 cm boylanabilen, kaliks tüp biçiminde, 5 dişli ve tüylü, Temmuz-Ağustos aylarında çiçeklenen bir türdür. Trakya, Batı ve Güney Anadolu’da yaygın olarak bulunmaktadır (Gürbüz ve ark. 2011). Şekil 2.10.1.1’de çalışmamızda kullanılan kekik (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link.) Ietswaart) görülmektedir.



**Şekil 2.10.1.1.** Çalışmamızda kullanılan kekik (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link.) Ietswaart)

Zengin bir bitki örtüsüne sahip olan Anadolu’da, pek çok *Origanum* türü halk arasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Origanum* türleri ticari öneme sahip, büyük miktarlarda ihraç edilen bitkilerdir. Avrupa’da Greek Oregano olarak bilinen, Türkiye’de ise İstanbul kekiği, Çanakkale kekiği gibi yöresel adlara sahip *Origanum vulgare*, ihracatı gerçekleştirilen ve ekonomik değere sahip bir türdür (Başer ve ark. 1994).

Doğal antioksidan kaynağı olan bitkiler açısından büyük bir potansiyele sahip olan Türkiye, dünyanın sayılı ülkelerinden biridir. Antioksidan özelliğinin yüksek olduğu bilinen bitkilerden olan kekik de ülkemizin önemli bitki ihraç ürünlerinden biridir.

Türkiye, dünya kekik ticaretinin yaklaşık %70'ini elinde tutmaktadır. Türkiye'de kekik olarak tanımlanan *Lamiaceae* familyasına ait pek çok hoş kokulu bitki türü bulunmasına rağmen, özellikle uçucu yağı karvakrol ve timol içeren türler kekik olarak kabul edilmektedir. Bu türler arasında *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* ve *Coridothymus* cinsleri hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır (Gürbüz ve ark. 2011).

### 2.10.2. Kekiğin kullanım alanları

Bitki çok değişik şekillerde kullanıma sahiptir *Origanum vulgare* iyi bilinen bir halk ilacı olup, hem tıp alanında hem de yemeklerde baharat olarak tüketilmektedir. Çeşitli kimyasal ve aromatik özelliklerinden dolayı, tarımda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde, besin maddelerini kokulandırmada, alkollü içeceklerde, parfümeride ve baharatların yapımında büyük ölçüde kullanılırlar (Novak ve ark. 2000). Ayrıca *Origanum*, sindirim, solunum sistemi rahatsızlıklarında, antiseptik, antispazmatik, gaz giderici, terletici, kadın hastalıklarında, uyarıcı, balgam, idrar ve gaz söktürücü, ses kısıklığı, öksürük, boğmaca, kellik ve uyuzluğun tedavisinde kullanılabilecek özelliklere sahiptir (Kılıç ve Bağcı 2008).

*Origanum* aşçılıkta da yıllardan beri kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde önemli bir kokulu bitki olup, Akdeniz mutfağında çok fazla kullanılmaktadır. Gıdalarda bozulmaya ve gıda zehirlenmelerine yol açan bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri nedeniyle son yıllarda fazlaca kullanılan bir baharat bitkisidir.

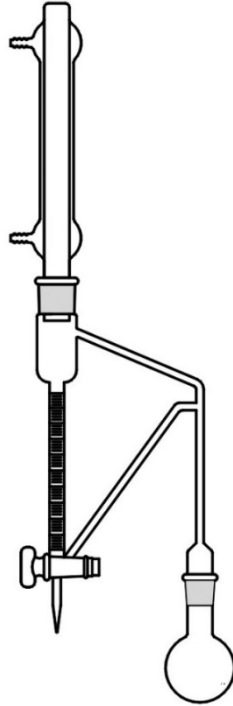
### 2.10.3. Kekik yağı ve yağ altı suyu

Son yıllarda ticari amaçla pek çok bitkinin uçucu yağları üretilmekte ve yağ altı suları da şişelenerek çeşitli markalar altında, gıda takviyesi şeklinde piyasaya sürülmektedir. Uçucu yağ, bitkilerin yaprak, meyve, kabuk veya kök kısımlarından elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, kolaylıkla kristalleşebilen genellikle renksiz veya açık sarı renkli, uçucu, kuvvetli kokulu, doğal bir üründür. Güzel kokulu olmasından dolayı esans ya da eterik yağ da denilmektedir. Su ile karışmadıkları için yağ olarak

tanımlansalar da sabit yağlardan farklıdır (Ceylan 1996). Yağ altı suyu, aromatik bitkilerden su destilasyonu ile uçucu yağ elde edilmesi esnasında toplama kabında biriken yağ altı suyunu ifade etmektedir. Ülkemizde gerek köylerde imbiklerle yapılan üretimler sonucu gerekse fabrikasyon üretimlerde uçucu yağlar üretilirken, yağ altı suları da bol miktarda elde edilmektedir (Kırimer ve ark. 2012).

Bitkilerden uçucu yağ ve yağ alt suyu etmek için, su destilasyonu, çözücü ekstraksiyonu gibi klasik yöntemlerin yanı sıra mikrodalga ekstraksiyonu ve katı-faz mikro ekstraksiyonu gibi modern yöntemler de kullanılmaktadır (Kılıç 2008).

Su destilasyonu uçucu bileşiklerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Küçük ölçekli üretimlerde clevenger aparatı ile yapılan destilasyon işlemi (Şekil 2.10.3.1.) endüstriyel uygulamalarda büyük destilasyon kazanlarında (imbik) gerçekleştirilmektedir. Yöntemin esası; soğutucuya bağlanan bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasına dayanmaktadır.



**Şekil 2.10.3.1.** Clevenger aparatı

Kekik suyu, bitkinin çiçekli dallarından su buharı destilasyonu ile elde edilir ve az miktarda fenolik bileşikler taşır. Genellikle sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Kırimer ve ark. 2012). Kekik suyunda bulunan uçucu bileşikler karvakrol ve timol olarak bildirilmektedir ve oranları kekiğin türüne göre değişmektedir. Kekik yağının da ana bileşenleri karvakrol ve timoldür (Gürbüz ve ark. 2011).

#### **2.10.4. Kekiğin kimyasal içeriği**

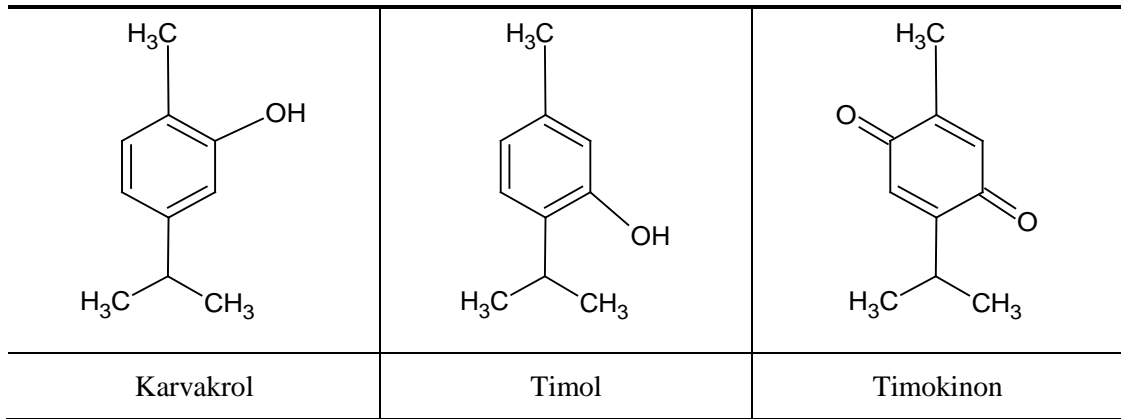
*Origanum vulgare* bitkisi ile yapılan çalışmalarda uçucu yağında %1-7 verim, % 23-80 oranında karvakrol tespit edilmiştir (Price ve Price 2011). Yalova'da yapılan bir çalışmada, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* L. bitkisinden elde edilen uçucu yağ oranları yıllara ve popülasyonlara göre değişim göstermiş, biçim zamanlarının da bitkinin uçucu yağı üzerinde etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Çiçeklenme döneminde biçilen bitkilerin en yüksek uçucu yağ oranına (% 6,17-6,71), çiçeklenme öncesi biçilen bitkilerin de en düşük uçucu yağ oranına (% 4,15-4,51) sahip olduğu bildirilmiştir (Karik ve ark. 2007).

Kekiğin uçucu yağ oranı ve bu yağın kimyasal bileşimindeki değişimlerin gözlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada, bitkinin yetiştiği yere göre içerdiği uçucu yağ miktarının ve uçucu yağın kimyasal bileşiminin değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 2.10.4.1.). *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* uçucu yağının incelenmesi sonucu ana bileşenlerinin *y*-terpinen, *p*-simen, timol ve karvakrol olduğu tespit edilmiştir (Karik ve ark. 2007).

**Çizelge 2.10.4.1.** Farklı yerlerden toplanan *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*'un uçucu yağının karvakrol ve timol içeriği

Bitki kaynağı	Kültür			Doğal	
	Uçucu yağ %	Timol (%)	Karvakrol (%)	Timol (%)	Karvakrol (%)
Çan/Çanakkale	5,7	0,6	81,0	1,4	80,9
Bayramiç/Çanakkale	5,1	0,5	85,2	1,2	82,9
Gökçeada/Çanakkale	5,4	42,3	15,9	48,1	31,9
Gökçeada/Çanakkale	5,4	0,7	88,6	1,8	75,7
Çanakkale/Yenice	4,9	8,3	69,6	5,0	73,2
Sındırgı/Balıkesir	4,6	68,0	8,7	60,1	7,5
İvrindi/Balıkesir	4,2	67,7	5,3	57,8	8,7
Gönen/Balıkesir	4,6	1,3	84,0	1,9	68,8
İzmit/Bursa	4,4	0,4	79,2	0,3	78,3
Lapseki/Çanakkale	5,0	36,6	14,2	52,3	29,1

Şekil 2.10.4.1.'de karvakrol, timol ve onların oksidasyonu ürünlerinden biri olan timokinonun moleküler yapısı verilmiştir.



**Şekil 2.10.4.1.** Karvakrol, timol ve timokinonun moleküler yapısı

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol), monoterenik fenol bileşiğidir. Antioksidan, antibakteriyel, antifungal etkisi olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 2003). Akciğer, meme ve lenf kanseri üzerine etkili olduğuna dair çalışmalar



bulunmaktadır. Timol (2-izopropil-5-metilfenol), karvakrolün geometrik izomeri olan, antioksidan özellikte aromatik bir monoterpendir. Antioksidan özelliğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Martins ve ark. 1999). Bir oksidasyon ürünü olan timokinonun antioksidan, antienflamatuar ve analjezik özelliklere sahiptir. Bazı bitkilerde, özellikle çörek otunda (*Nigella sativa*) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda pek çok farklı kanser hücresi üzerinde etkili olduğu, normal hücreler için ise çok düşük toksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Badary 1999).

Kekik yağının içerdiği yüksek oranda karvakrol ve timol nedeni ile sahip olduğu antibakteriyel ve antifungal etkilerinden dolayı gıdaların bozulmadan saklanması için kullanılabileceği belirlenmiştir (Chun ve ark. 2004). Ayrıca, bitkilerde antioksidan olarak bulunan maddeler, bitkileri DNA'yı parçalayan ve hücre ölümüne neden olan gün ışığı, bitkinin bozulması gibi çeşitli yollarla oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur. Bitkiler üzerinde böyle bir etkisi olan bu maddelerin aynı etkiyi insan DNA'sı üzerinde yapabileceği de düşünülebilir. Bu nedenlerden dolayı kekik önemli biyolojik özelliklere sahip, zengin fenolik bileşik içeriği nedeniyle araştırılması gereken, sonuçları bilime ve günümüz hastalıklarına ışık tutabilecek doğal bir materyaldir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan maddeler

###### 3.1.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.1.1.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.1.1.1.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Asetonitril	Merck	100030
Buzağı timüs DNA'sı	Sigma-Aldrich	D4522
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich	E6758
Etanol	Sigma-Aldrich	34870
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haen	12354
Formik asit	Merck	100263
Gallik asit	Sigma-Aldrich	G7384
HCl	Merck	100314
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	16911
Karvakrol	Aldrich	282197
Katalaz	Sigma-Aldrich	C1345
Metanol	Merck	106007
NaCl	Sigma-Aldrich	S3014
NaOH	Riedel-de Haen	06203
N,O-bis(trimetilsilil)trifloroasetamit	Aldrich	15222

**Çizelge 3.1.1.1.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Piridin	Sigma-Aldrich	270970
Proteinaz K	Sigma-Aldrich	P2308
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
Timokinon	Sigma-Aldrich	274666
Timol	Sigma-Aldrich	16254
Trimetilklorosilan	Merck	102333
Trolox	Sigma-Aldrich	238813
5-hidroksimetil urasil	Sigma-Aldrich	852589
8-hidroksi-2'-deoksiguanozin	Sigma-Aldrich	H5653
5,6-dihidroksi metilurasil	Sigma-Aldrich	D7628
4,6-diamino-5-nitropirimidin	Sigma-Aldrich	S454605
2,8-dihidroksi adenin	TRC	D45105
5-hidroksimetil sitozin	TRC	H945870
2-hidroksiadenin	TRC	I819000
5,6-dihidro timin	TRC	D449440
5-hidroksihidantoin	TRC	H943000
5-hidroksi-5-metilhidantoin	TRC	H947500
4,6-diamino-5-formamidopirimidin	Santa Cruz	217034
5-formilurasil	IS Chemical Tech	1195080
Alloxan	Titan Biotech	2244113

### 3.1.1.2. Çözeltiler

DNA oksidatif hasar ürünlerinin standartlarının çözeltileri: Her bir DNA oksidatif hasar ürününün çözeltisi 200 mg/L konsantrasyonda piridin içerisinde ayrı ayrı hazırlanmıştır. 0,0050 g DNA oksidatif baz hasar ürünü tartılarak piridin ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Tüm seyreltme işlemleri de piridin ile yapılmıştır.

Karvakrol, timol, timokinon çözeltileri: Her bir antioksidanın çözeltilisi metanol içerisinde ayrı ayrı 40 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Karvakrol ve timol 0,060 g tartılıp, Timokinon 0,066 g tartılıp 25 mL'ye tamamlanmıştır. Hücre kültürü ortamına eklenen çözeltiler dimetilsülfoksit içerisinde hazırlanmıştır.

Lizis tamponu: 7,88 g tris-HCl, 0,5840 g EDTA, 0,0584 g NaCl, 1 g SDS, 0,05 g proteinaz K tartılıp 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8'e ayarlanıp 100 mL'ye tamamlanmıştır.

ABTS stok çözeltilisi: 0,0960 g ABTS ve 0,0166 g  $K_2S_2O_8$  tartılıp saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. 24 saat karanlıkta ekletildikten sonra saf su ile 1/10 seyrelerek kullanılmıştır.

10 mM  $Fe^{2+}$  çözeltilisi: 0,139 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  tartılıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

10 mM  $H_2O_2$  çözeltilisi: 9,79 M stok  $H_2O_2$  çözeltilisinden 205  $\mu$ L alınıp saf su 10 mL'ye tamamlanarak 200 mM ara stok çözeltili hazırlanmıştır. 200 mM çözeltiliden 1,25 mL alınıp saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak 10 mM çözeltili hazırlanmıştır.

Lowry A çözeltilisi: 0,4 g NaOH ve 2,0 g  $Na_2CO_3$  tartılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Lowry B çözeltilisi: 1,0 g  $NaKC_4H_4O_6$  ve 0,5 g  $CuSO_4$  tartılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Lowry C çözeltilisi: 100 mL Lowry A çözeltilisine 1 mL Lowry B çözeltilisi eklenerek hazırlanmıştır.

### 3.1.1.3. Kekik

Çalışmada kullanılan kekik (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link.) Ietswaart) Çan/Çanakkale'den toplanmıştır. Tür tayini Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan araç-gereçler çizelge 3.1.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.2.1.** Çalışmada kullanılan araç-gereçler

Araç-Gereç	Marka	Model
Liyofilizatör	Labconco	Freezone 2.5 Plus
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Velp	ARE
Çoklu manyetik karıştırıcı	Wisd	MS-MP8
Vorteks karıştırıcı	Wisd	VM-10
Ultrasonik banyo	United	2.8 L
Etüv	VWR	Dry-line
İnkübatör	Memmert	INB 400
Balon ısıtıcı	Electromantle	EM 0500
Santrifüj	Hermle	Z 206 A
pH-metre	Hanna	HS221
Analitik terazi	Mettler Toledo	MS105DU
Saf su cihazı	Elga Purelab	Option Q DV25
Ayarlanabilir otomatik mikropipet (500-5000 µL)	Eppendorf	Research
Ayarlanabilir otomatik mikropipet (100-1000 µL)	Eppendorf	Research
Ayarlanabilir otomatik mikropipet (10-100 µL)	Eppendorf	Research

### **3.1.3. Çalışmada kullanılan analitik cihazlar**

#### **3.1.3.1. Gaz kromatografi-kütle spektrometre/kütle spektrometre**

DNA oksidatif hasar ürünlerinin analizi, Thermo Scientific Trace 1300 gaz Kromatografi-kütle spektrometre/kütle spektrometre ile gerçekleştirilmiştir. Cihaza AI 1310 oto örnekleyici ile numune enjeksiyonu otomatik olarak yapılmıştır. Maddelerin tayini TSQ8000 Evo kütle spektrometre/kütle spektrometre ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde DB-5MS (Agilent 128-5512) kapiler kolon (uzunluk: 12 m, iç çap: 0,20 mm, film kalınlığı: 0,33 µm) kullanılmıştır.

#### **3.1.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi**

Antioksidan maddelerin tayini, Agilent 1200 serisi yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz degazör, ikili pomp, otomatik örnekleyiciye sahiptir. Maddelerin tayini diyot seri dedektör ile yapılmıştır. Analizlerde Waters Xbridge C18 (uzunluk: 250 mm, iç çap: 4,6 mm, tanecik çapı: 3,5 µm) kolon kullanılmıştır.

#### **3.1.3.3. Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi**

Toplam fenolik madde, antioksidan kapasite, kantitatif DNA tayini ve Fenton reaksiyonu takibi Varian Cary 50 Conc ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Tek ışın yollu olan spektrofotometrede ölçümler kuartz küvet kullanılarak yapılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kekik bitkisinden antioksidan maddelerin ekstraksiyonu

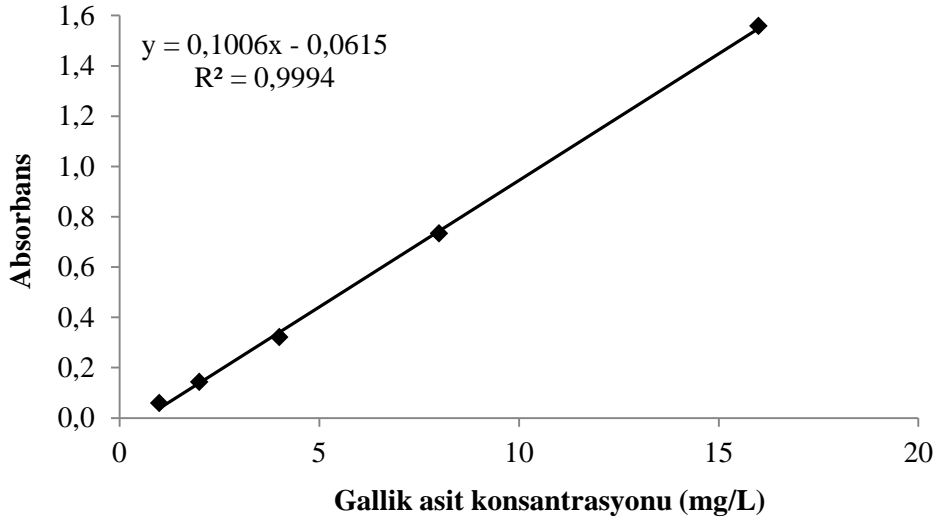
Kekik bitkisi kurutulmuş olarak satın alınmıştır. Dallarından yaprakları ayrılarak, sadece yaprak kısımlarıyla çalışılmıştır. Su ve metanol-su çözücüleri kullanılarak manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyo yardımıyla 2 saat ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyonlarda 4,0 g kuru kekik ve 80 mL çözücü kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonunda süzme yapılarak ekstraktlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Kekik yağı ve distile suyu eldesi

Kekik yağı ve distile suyu clevenger cihazı kullanılarak elde edilmiştir. 40,0 g kuru kekik bir balona alınıp üzerine 400 mL saf su eklenmiştir. Balonun üzerine clevenger cihazı ve onun üzerine geri soğutucu bağlanmıştır. Balon, balon ısıtıcıya yerleştirilerek 7 saat kaynatılmıştır. Süre sonunda 40 mL kekik distile suyu ve 1,5 mL kekik yağı elde edilmiştir. Elde edilen yağ ve yağ altı suyu cam şişelere alınarak buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini çalışmalarında standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri hazırlanmıştır. 0,1 M NaOH içinde %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> olacak şekilde Lowry A çözeltisi ve %1'lik NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> içinde %0,5 CuSO<sub>4</sub> olacak şekilde Lowry B çözeltisi hazırlandı. Lowry A ve Lowry B 50:1 (v/v) oranında karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz tüplerine x mL örnek/standart ve (2-x) mL saf su, 2,5 mL Lowry C çözeltisi ve 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra, örneklerin ve standartların 750 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Standartların konsantrasyonuna karşılık absorbans grafiği çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 3.2.3.1). Numuneler için toplam fenolik madde miktarları belirlenen kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

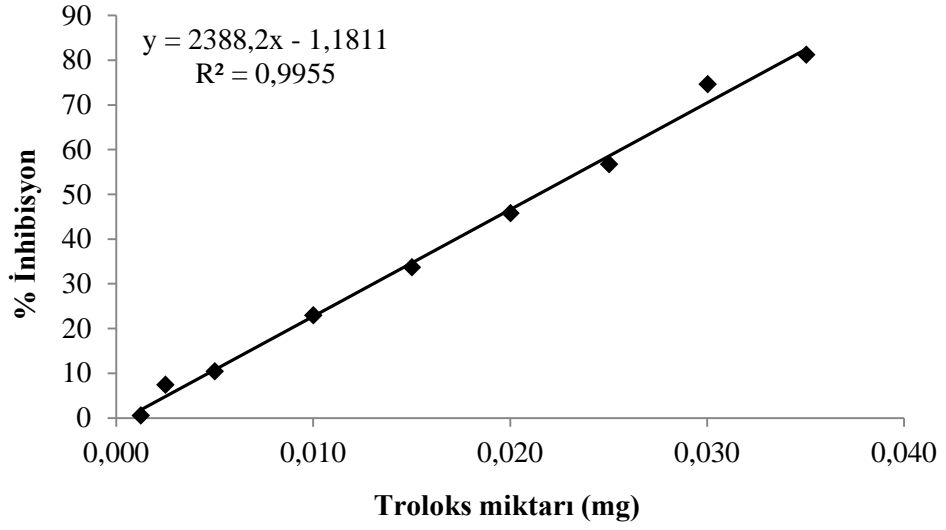


Şekil 3.2.3.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için çizilen kalibrasyon grafiği

### 3.2.4. Antioksidan kapasite tayini

Antioksidan kapasite tayininde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltileri hazırlanmıştır. Etanolde 6 mM ABTS stok çözeltisi hazırlanarak, analizler için 1:10 oranında saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Analiz için x mL örnek/standart üzerine (4-x) mL etanol eklenmiştir. Üzerine seyreltilmiş ABTS çözeltisinden 1 mL eklenerek 6 dk beklenip, 734 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Antioksidan madde içermeyen kör örneğin absorbansına göre her bir numunenin % inhibisyon değeri hesaplanmıştır. Troloks miktarına karşılık % inhibisyon grafiği çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 3.2.4.1). Numuneler için antioksidan kapasite miktarları belirlenen kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.





Şekil 3.2.4.1. ABTS yöntemi için çizilen kalibrasyon grafiği

### 3.2.5. Ekstraktların HPLC ile analizi

#### 3.2.5.1. Fenolik maddelerin tayini

Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizi için 10 µL enjeksiyon hacmi ve 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında asetonitril ve formik asitin sudaki %1'lik (h/h) çözeltisinden oluşan gradient hareketli faz programı uygulanmıştır. HPLC-DAD için çalışma koşulları Çizelge 3.2.5.1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.5.1.1. HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	%1'lik formik asit	asetonitril
0	%90	%10
10	%87	%13
20	%58,5	%41,5
25	%30	%70
30	%90	%10
35	%90	%10

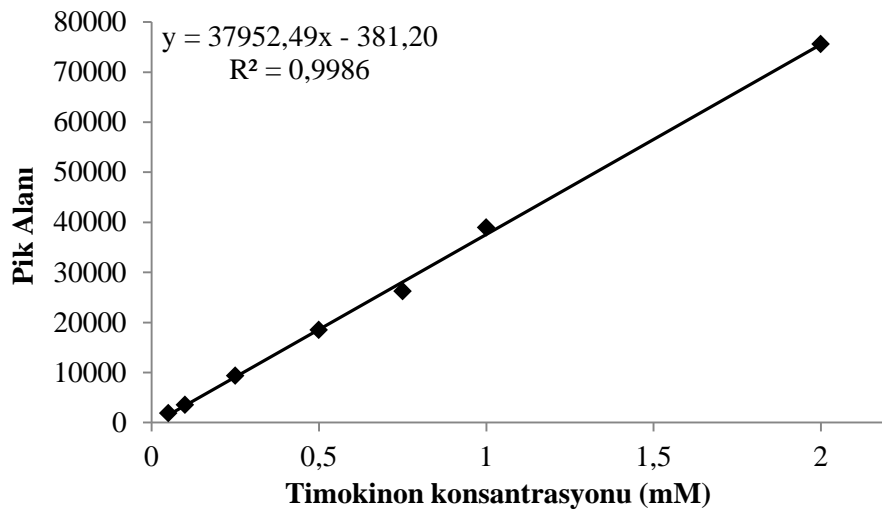
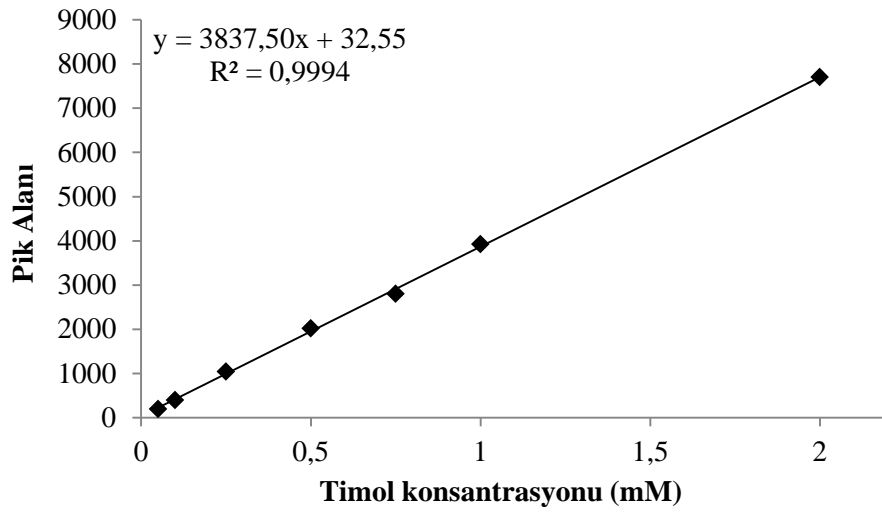
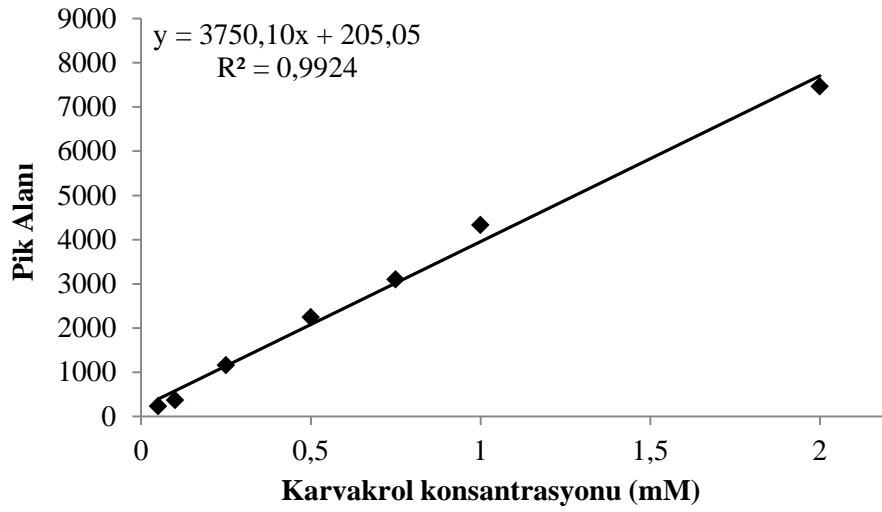
### 3.2.5.2. Karvakrol, timol ve timokinon tayini

Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizi için 10 µL enjeksiyon hacmi ve 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında asetoneitril ve saf sudan oluşan izokratik hareketli faz programı uygulanmıştır. HPLC-DAD için çalışma koşulları Çizelge 3.2.5.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.5.2.1.** HPLC-DAD izokratik hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	Saf su	asetoneitril
0	%42	%58
20	%42	%58

Kantitatif tayin yapabilmek için karvakrol, timol ve timokinonun farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanıp, enjeksiyonu yapılarak ve timol için 273 nm dalga boyundaki, Timokinon için 254 nm dalga boyundaki pik alanları alınmıştır. Konsantrasyona karşılık pik alanı grafikleri çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 3.2.5.2.2.).



Şekil 3.2.5.2.1. Karvakrol, timol ve timokinon için çizilen HPLC kalibrasyon grafikleri

### 3.2.6. Fenton reaksiyonu

Fenton reaksiyonunun karvakrol, timol ve timokinon moleküllerine etkisini görebilmek için, çizelge 3.2.6.1.'de belirtilen koşullarda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2.6.1.** Fenton reaksiyonu koşulları

Antioksidan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup>
400 µM Karvakrol	200 µM	100 µM
400 µM Timol	200 µM	100 µM
40 µM Timokinon	20 µM	10 µM

Belirtilen konsantrasyonlardaki maddeleri içeren çözeltiler saf su içerisinde 100'er mL hazırlanarak 37 °C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir.

### 3.2.7. Fenton reaksiyonunun spektrofotometrik ve kromatografik takibi

37 C'deki inkübatöre koyulan çözeltilerden 5 saate kadar belirli zaman aralıklarında 5'er mL alınarak Fenton reaksiyonunu durdurmak için üzerlerine 50 µL 0,6 mg/mL katalaz çözeltisi eklenmiştir. Fenton reaksiyonu durdurulduktan sonra UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 200-400 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır. HPLC ile antioksidan maddelerin kantitatif tayinleri yapılmıştır.

### 3.2.8. DNA oksidatif hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile analizi için metot geliştirme

DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin analizi Çizelge 3.2.8.1.'deki koşullar ve Çizelge 3.2.8.2.'deki sıcaklık programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2.8.1.** GC-MS/MS çalışma koşulları

Enjeksiyon hacmi	2 µL
Enjeksiyon modu	Split
Split oranı	5
Enjeksiyon sıcaklığı	250 °C
Ara yüzey sıcaklığı	280 °C
İyon kaynağı sıcaklığı	250 °C
Hareketli faz akış hızı	1 mL/dk
Tarama modu	SRM (SIM/SIM)
GC program süresi	17 dk

**Çizelge 3.2.8.2.** GC-MS/MS sıcaklık programı

Oran (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dk)
-	130	2
8	230	0
20	280	0

Belirtilen koşullarda, analiz edilecek DNA oksidatif hasar ürünlerinin her birinin enjeksiyonu yapılmıştır. GC-MS/MS ile DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin analizi için seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) tekniği kullanılmıştır. Her bir madde için alıkonma zamanı, 70 eV ile yapılan 1. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler, 2. iyonlaşma için uygulanacak en uygun en uygun enerji ve 2. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler belirlenmiştir.

### **3.2.9. DNA oksidatif hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması**

18 adet DNA oksidatif baz hasar ürünü standardının çözeltileri hazırlandıktan sonra bu hasar ürünlerinin tamamını içeren stok karışım çözelti piridin içinde hazırlanmıştır. Stok çözelti farklı konsantrasyonlara seyreltilerek uygun koşullarda, % 1 TMCS (trimetilklorosilan) içeren BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifloroasetamit) ile

türevlendirildikten sonra her bir numune 2 tekrarlı olarak GC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık pik alanı grafikleri çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemleri hesaplanmıştır.

### **3.2.10. Buzağı timüs DNA'sı ile yapılan çalışmalar**

Saf su içerisinde 50 µg/mL konsantrasyonda buzağı timus DNA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak, 100 µg DNA içeren çözeltiliye ayrı ayrı 40'ar µM ve 400'er µM karvakrol, timol ve timokinon eklenmiştir. Üzerlerine 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 100 µM Fe<sup>2+</sup> eklenerek Fenton reaksiyonu oluşturulmuştur. Sonuçta, sadece DNA; DNA + antioksidan; DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>; DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> + antioksidan içeren numuneler hazırlanmıştır. 37 °C'de 15 dk bekletildikten sonra dondurulup liyofilize edilmiştir. Üzerine 1 mL %60 formik asit çözeltisi eklenip 130 °C'de 30 dk bekletilerek DNA hidroliz edilmiştir. Tekrar dondurulup liyofilize edildikten sonra, % 1 TMCS içeren BSTFA türevlendirilip GC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

### **3.2.11. Malign ve sağlıklı akciğer hücreleri ile yapılan çalışmalar**

Hücre kültürü çalışmaları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

#### **3.2.11.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması**

Hücreleri çoğaltmak amacıyla, -80°C'de kriyovial içinde saklanan malign (A549) ve sağlıklı (BEAS-2B) hücre soyları, sıcak su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözülmüştür. Hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 5 mL RPMI 1640 besiyeri içerisine alınmıştır. Falcon tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra sulu üst kısım çekilip, hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Falcon tüp üzerine 4 mL besiyeri ilave edilip, 5 mL'lik hücre süspansiyonu 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisine alınarak 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir.

### 3.2.11.2. Hücre soylarının pasajlanması

A549 ve BEAS-2B hücre soyları için besiyeri ortamı %10 fetal bovine serum, %1 penisilin-streptomisin çözeltisi (10000 U/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanılan hücreler, 25 cm<sup>2</sup>'lik flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flaks içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin serumdan tamamen arındırılması için 25 cm<sup>2</sup>'lik flaks içerisine 2 mL 1X fosfat tampon çözeltisi (PBS) ilave edilip, hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin ayrılması için 0,5 mL % 0,05 Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak, 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk bekletilmiştir. Hücrelerin tamamı yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edilerek yüzeyden ayrılan hücrelerin, hücre membranlarının tripsinden zarar görmesi engellenmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olacak şekilde) 15 mL'lik falkon tüp içerisine alınmıştır. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sulu üst kısım çekilip, elde edilen hücre pelleti 1 mL hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9 mL besiyeri ilave edilmiştir. 10 mL'lik hücre süspansiyonu 75 cm<sup>2</sup>'lik flakslara alınarak 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmıştır.

### 3.2.11.3. Hücrelerin sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µL 0,5 mL'lik tüpe alınıp, üzerine eşit miktarda % 0,5 tripan mavisi koyularak karıştırılmıştır. Hematositometre distile su ile iyice temizlendikten sonra, karışımdan 12 µL alınarak thoma lamına koyulup, mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı seyreltme katsayısı ile çarpılarak 1 mL besiyerinde bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

#### 3.2.11.4. SRB (sulforhadamine B) metodu

SRB metodu hücre kültüründe sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan, hücre çoğalmasını ölçmek için uygun olan hücrelerdeki toplam protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metottur. Sülforhodamin B (SRB) protein bağlayabilen anyonik bir boyadır. Triklorasetik asit (TCA) ile sabitlenen pH altında aminoasitler ile bir kompleks oluşturarak renk değişimi gözlenmektedir. Bu renk değişimi 560 ve 580 nm dalgaboylarında ölçülmektedir.

Pasajlama işleminden sonra 75 cm<sup>2</sup>'lik flask içerisindeki hücreler, hücre pasaj yöntemindeki gibi tripsin ile kaldırılmıştır. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 mL'lik falkon tüp içerisine alınmıştır. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sulu üst kısım uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelleti 1 mL hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9 mL besiyeri ilave edilerek 10 mL'lik hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücreler, 96 kuyulu plaka içerisine son hacim 200 µL medium (RPMI1640) içinde 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Kör (negatif kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200 µL medium eklenmiştir.

Etkisi incelenecek maddelerin 40 mM stok çözeltileri dimetilsülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmıştır. SRB testi için, örneklerin farklı konsantrasyonları (10-80 µM) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulanmıştır. Hücreler sayılarak 100 µL besiyeri içerisinde  $10^4$  hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edilmiştir. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanılmıştır. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 µL besiyeri ilave edilmiştir. Ardından hücreler, 48 ve 72 saat 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya 50 µL %10 (w/v) TCA eklenerek ve +4 °C' de 1 saat bekletilmiştir. Süre sonunda plaka ters çevrilerek TCA dökülmüştür. TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez, deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda % 0,4 (w/v) SRB çözeltisinden her kuyuya 50 µL eklenip, 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme sonrası SRB plakadan dökülerek uzaklaştırılmıştır.



Bağlanmış boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez %1'lik asetik asitle yıkanmıştır. Yıkama sonunda plaka kurduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için, 10 mM pH 10 tris çözeltisi (150 µL/kuyu) eklenmiş ve 10 dk 150 rpm'de çalkalanmıştır. ELISA okuyucuda 564 nm'de absorbans okunmuştur.

#### % Canlılık hesabı:

Örnek uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, antioksidan uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(\text{Bileşik ile muamele edilmiş hücre absorbansı} - \text{kör numune absorbansı})}{(\text{kontrol hücre absorbansı} - \text{kör numune absorbansı})} \times 100$$

#### **3.2.11.5. Örneklerin uygulanması**

Pasajlama işleminden sonra sayılan hücreler, flask içerisinde  $3 \times 10^6$  hücre olacak şekilde toplam 9 adet 75 cm<sup>2</sup> flask içerisine alınarak 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat sonra her bir flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her biri ayrı ayrı 75 cm<sup>2</sup> flasklar içinde 10 mL besiyeri üzerine timol, timokinon, karvakrol, kekik suyu, kekik yağı, kekik su ve kekik su-metanol ekstraktı eklenerek hazırlanmıştır. Ayrıca her bir örnek içerisine, son konsantrasyonu 20 µM olacak şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Negatif kontrol grubu için sadece 10 mL besiyeri ve peroksit grubu için 10 mL besiyeri içinde 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir.

48 saat muamele sonunda flasklar içerisindeki besiyeri çekilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra tampon çözelti çekilerek uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için % 0,05 Tripsin-EDTA çözeltisi eklenip, 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk bekletilmiştir. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan falkon tüpe alınmıştır. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sulu üst kısım çekilerek hücre kümesi elde edilmiştir.

### 3.2.12. Hücrelerden DNA izolasyonu

Hücre kümelerinin bulunduğu tüplerin içerisine 1 mL lizis tamponu eklenerek 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda üzerine 0,5 mL doygun NaCl çözeltisi eklenip, vorteks ile karıştırıldıktan sonra 56 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 4000 x g'de, 45 dakika santrifüj edildikten sonra DNA'yı içeren sulu faz yeni bir tüpe alınmıştır. Sulu fazın üzerine 3 mL soğuk susuz etanol eklenip yavaşça karıştırılarak DNA'nın görünür hale gelmesi sağlanmıştır. DNA içeren tüpler 3000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz pipetle çekilip atılarak, DNA pellet halinde elde edilmiştir.

DNA'nın yıkanması: DNA'nın üzerine 200 µL %70'lik etanol eklenip çalkalanmıştır. 3000 x g'de 5 dk santrifüj yapıp sıvı faz pipetle çekilip atılmıştır. Aynı işlem 250 µL %70'lik etanol eklenerek tekrar edilmiştir. Elde edilen DNA pelletlerinin saf su içerisinde çözünmeleri için 3 mL saf su eklenip +4 °C'de 48 saat bekletilmiştir.

### 3.2.13. DNA miktarı tayini

DNA'nın miktar ve saflık tayini spektrofotometrik olarak yapılmıştır. DNA saf su içerisinde tamamen çözüldükten sonra elde edilen çözeltinin 260 ve 280 nm'de absorbansı ölçülmüştür.  $A_{260}/A_{280}$  oranından saflık derecesi belirlenmiştir. 260 nm'deki absorbans değerinin 50 ile çarpılması ile µg DNA miktarı hesaplanmıştır.

$$\mu\text{g DNA} = A_{260} \times 50$$

100 µg DNA içerecek şekilde ayrılan örnekler dondurulduktan sonra -86 °C'de 100 mbar basınç altında liyofilize edilmiştir.

### 3.2.14. DNA numunelerinin GC-MS/MS ile analizi

Liyofilize edilmiş olan DNA üzerine 1 mL % 60 formik asit eklenip 130 °C'de 30 dk bekletilerek hidroliz edilmiştir. Hidroliz edilen numune dondurulduktan sonra -86 °C'de 100 mbar basınç altında liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası üzerine 40 µL

piridin ve 60  $\mu$ L % 1 TMCS içeren BSTFA eklenerek 120  $^{\circ}$ C'de 40 dk tevlendirilmiştir. Tevlendirilen numuneler hiç bekletilmeden GC-MS/MS ile analiz edilmiştir.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Kekik (*Origanum vulgare* L.) Bitkisinin Antioksidan Özellikleri

40 g kekikten clevenger aparatı ile 40 mL yağ altı suyu ve 1,5 mL kekik yağı elde edilmiştir. Ayrıca su ve metanol-su ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde, antioksidan kapasite ve HPLC analizleri yapılmıştır.

#### 4.1.1. Toplam fenolik madde tayini

Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılan toplam fenolik madde tayini sonuçları çizelge 4.1.1.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.1.1.** Kekikten hazırlanan numunelerin toplam fenolik madde miktarları

	<b>Toplam fenolik madde (mg gallik asit/mL)</b>
Kekik yağı	143,10 ± 1,30
Kekik yağ altı suyu	0,29 ± 0,01
Su ekstraktı	1,41 ± 0,03
Metanol-su ekstraktı	3,15 ± 0,12

Kekik yağı, kekik yağ altı suyuna göre çok daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahiptir. Metanol-su ekstraktı da su ekstraktından daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahiptir.

#### 4.1.2. Antioksidan kapasite tayini

ABTS yöntemiyle yapılan antioksidan kapasite tayini sonuçları çizelge 4.1.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.2.1.** Kekikten hazırlanan numunelerin antioksidan kapasite değerleri

	<b>Antioksidan kapasite</b> (mg troloks/mL)
Kekik yağı	271,73 ± 11,45
Kekik yağ altı suyu	0,39 ± 0,04
Su ekstraktı	1,74 ± 0,15
Metanol-su ekstraktı	5,12 ± 0,41

Antioksidan kapasite değerleri de toplam fenolik madde içeriği ile paralel şekilde kekik yağının kekik yağ altı suyundan ve metanol-su ekstraktının su ekstraktından daha yüksek olarak bulunmuştur.

#### **4.1.3. HPLC analizi**

Kekikten hazırlanan numunelerin içerdiği antioksidan maddeler ve miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.1.3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.3.1.** Kekikten hazırlanan numunelerin HPLC sonuçları

	Kekik yağ altı suyu (mg/L)	Kekik yağı (mg/mL)	Su ekstraktı (mg/L)	Metanol-su ekstraktı (mg/L)
Karvakrol	198 ± 2,8	100,3 ± 1,2	38,4 ± 1,2	175,1 ± 7,3
Timol	921 ± 8,6	513,8 ± 3,1	128,6 ± 5,2	612,0 ± 9,5
Protokatekuik asit	ND	ND	4,1 ± 0,2	14,5 ± 0,9
Kafeik asit	ND	ND	11,3 ± 0,9	20,2 ± 1,7
Epikateşin	ND	ND	21,2 ± 1,8	40,1 ± 3,2
Rosmarinik asit	ND	ND	103,7 ± 2,9	344,5 ± 7,1

ND: tespit edilmedi

HPLC analizleri sonucunda, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri yüksek çıkan numunelerin daha yüksek oranda antioksidan madde içerdiği belirlenmiştir. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda, *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* türü kekiğin en yüksek oranda içerdiği antioksidanların karvakrol ve timol

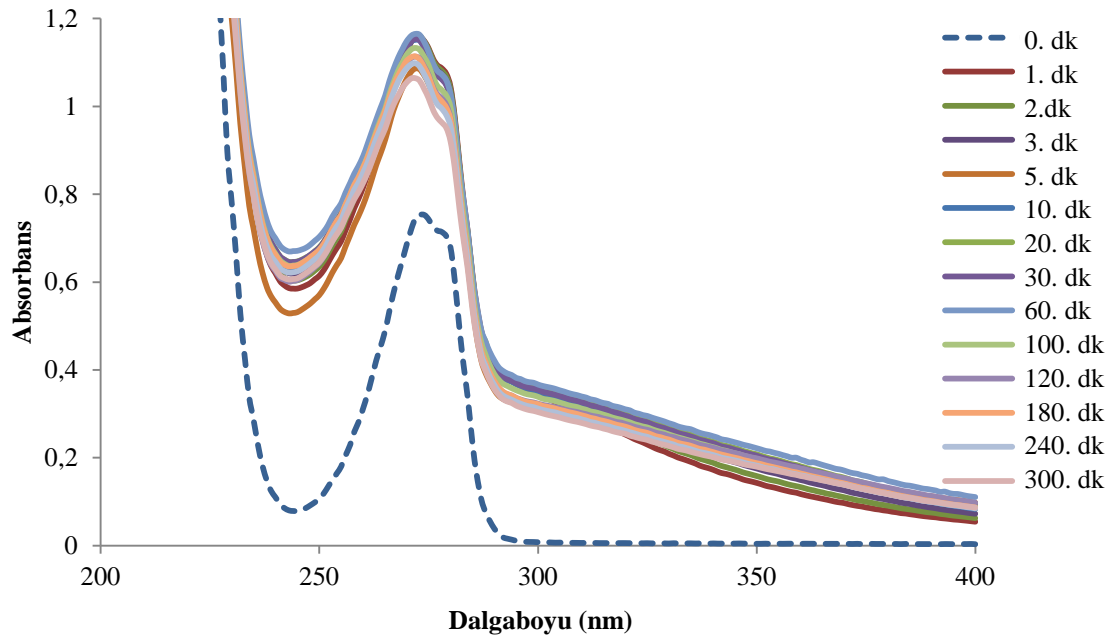
olduğu, bunların oranlarının kekiğin yetiştiği bölge ve toplnma zamanına göre değiştiği belirtilmiştir (Başer ve ark. 1994, Karik ve ark. 2007). Çalıştığımız kekikte de en yüksek miktarda bulunan antioksidan maddelerin timol ve karvakrol olduğu, timolün karvakrolden daha yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.

## 4.2. Fenton Reaksiyonu alışmaları

Karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin Fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı özellikleri araştırılmıştır.

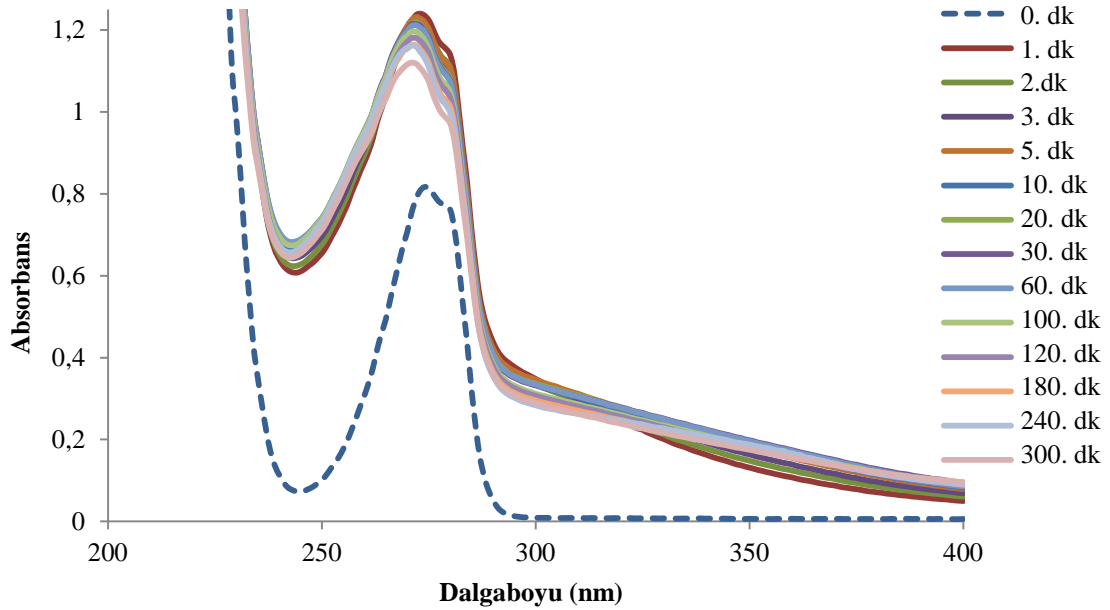
### 4.2.1. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme etkisinin spektrofotometrik incelenmesi

400  $\mu\text{M}$  karvakrol, 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  karıştırılarak 37  $^\circ\text{C}$ 'de Fenton reaksiyonu başlatılmıştır. UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 200-400 nm dalga boyları arasında, 300 dk boyunca belirli zaman aralıklarında bu çözeltiden numune alınıp Fenton reaksiyonu durdurularak spektrum taraması yapılmıştır (şekil 4.2.1.1.).



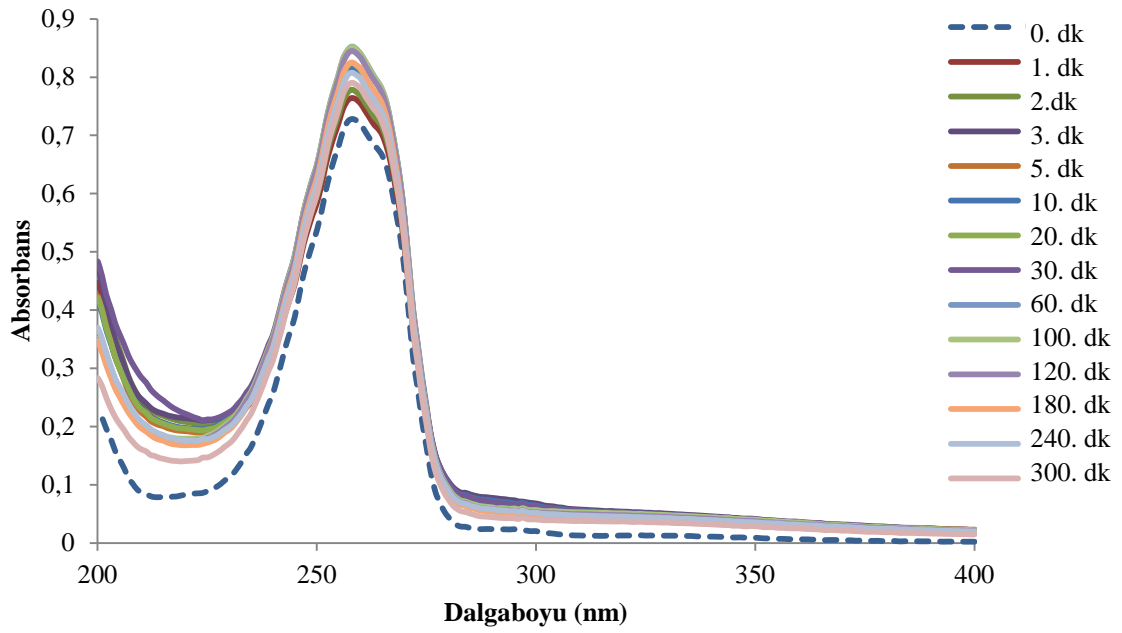
şekil 4.2.1.1. Karvakrolün Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 400  $\mu\text{M}$  karvakrol; 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ; sıcaklık 37  $^\circ\text{C}$ )

400  $\mu\text{M}$  timol, 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  karıştırılarak 37 °C’de Fenton reaksiyonu başlatılmıştır. UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 200-400 nm dalga boyları arasında, 300 dk boyunca belirli zaman aralıklarında bu çözeltilerden numune alınıp Fenton reaksiyonu durdurularak spektrum taraması yapılmıştır (Şekil 4.2.1.2.).



**Şekil 4.2.1.2.** Timolün Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 400  $\mu\text{M}$  karvakrol; 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ; sıcaklık 37 °C)

40  $\mu\text{M}$  timokinon, 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  karıştırılarak 37 °C’de Fenton reaksiyonu başlatılmıştır. UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 200-400 nm dalga boyları arasında, 300 dk boyunca belirli zaman aralıklarında bu çözeltilerden numune alınıp Fenton reaksiyonu durdurularak spektrum taraması yapılmıştır (Şekil 4.2.1.3.).



**Şekil 4.2.1.3.** Timokinonun Fenton reaksiyonu ile oksidasyonu (Reaksiyon koşulları: 40  $\mu\text{M}$  timokinon; 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ; sıcaklık 37  $^\circ\text{C}$ )

Karvakrol ve timolün en yüksek absorpsiyon yaptığı dalga boyu 273 nm ve timokinonun en yüksek absorpsiyon yaptığı dalga boyu 254 nm olarak tespit edilmiştir. Fenton reaksiyonu sonucu karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin hızlı bir şekilde hidroksil radikali ile reaksiyona girdiği spektrumdaki değişimlerden anlaşılmaktadır. Fenton reaksiyonu sonrası absorbans değerlerinde artış olduğu görülmektedir.

Fenton reaksiyonu sonrası gözlenen absorbans artışlarını açıklayabilmek için karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin 254 ve 273 nm’de molar sönüm katsayıları belirlenmiştir. Katsayılar çizelge 4.2.1.1.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1.1.** Karvakrol, timol ve timokinon moleküllerinin 254 ve 273 nm’de molar sönüm katsayıları

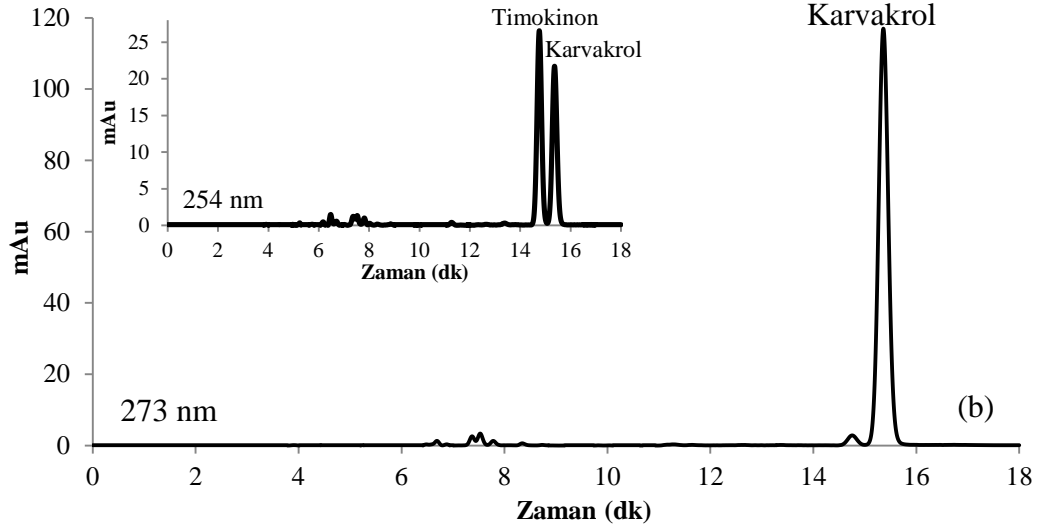
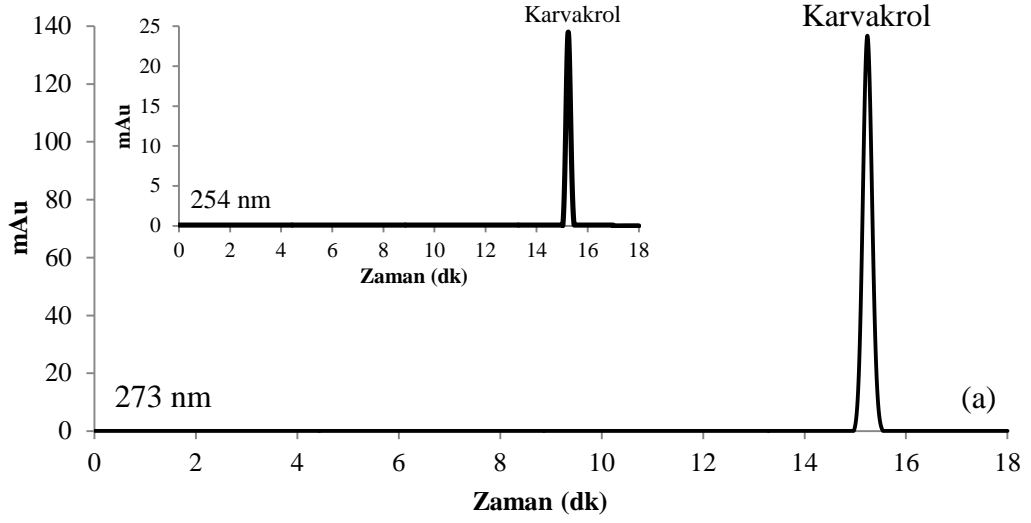
	$\epsilon_{254 \text{ nm}}$ ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon_{273 \text{ nm}}$ ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
Karvakrol	781	2233
Timol	621	2031
Timokinon	20266	6953



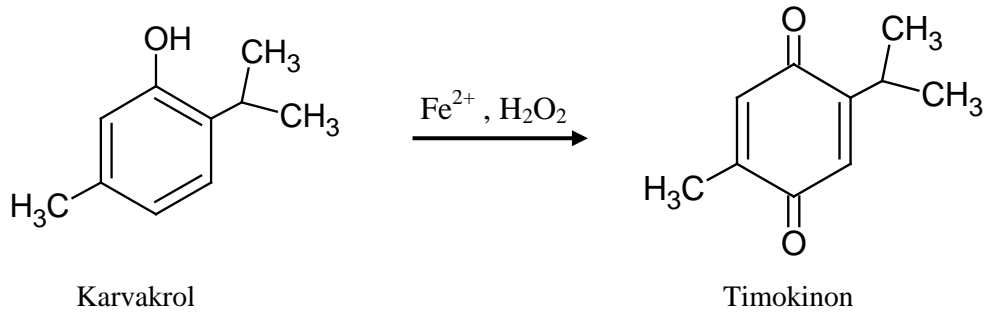
273 nm dalgaboyunda timokinonun molar sönüm katsayısının karvakrol ve timolden 3 kattan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle karvakrol ve timolün Fenton reaksiyonu sonucu spektrumlarında gözlenen absorpsiyon artışı oksidasyon ürünü olarak oluşan timokinondan kaynaklandığı görülmüştür. HPLC ile yapılan çalışmalar sonucu karvakrol ve timolün oksidasyon ürünlerinden birinin timokinon olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.2.2. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme etkisinin HPLC ile incelenmesi**

Karvakrol çözeltisinin Fenton reaksiyonu öncesi ve 10 dk sonrası HPLC ile kromatografik analizi yapılmıştır. Fenton reaksiyonu sonrası karvakrol miktarında azalma gözlenmiştir. Yan ürün olarak timokinon oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2.2.1.'de görülmektedir.

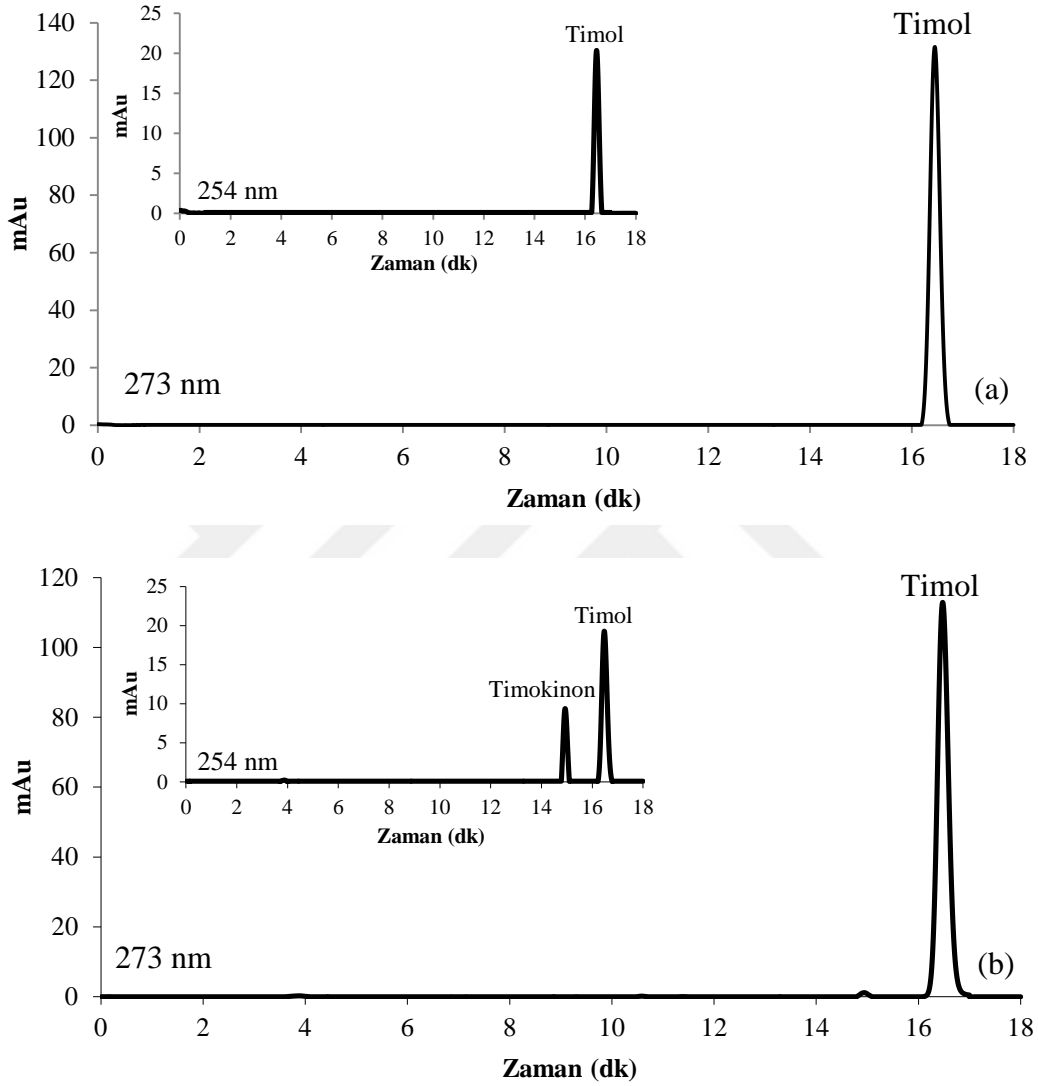


**Şekil 4.2.2.1. (a)** 400  $\mu\text{M}$  karvakrol çözeltisinin kromatogramı  
**(b)** 400  $\mu\text{M}$  karvakrol çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı

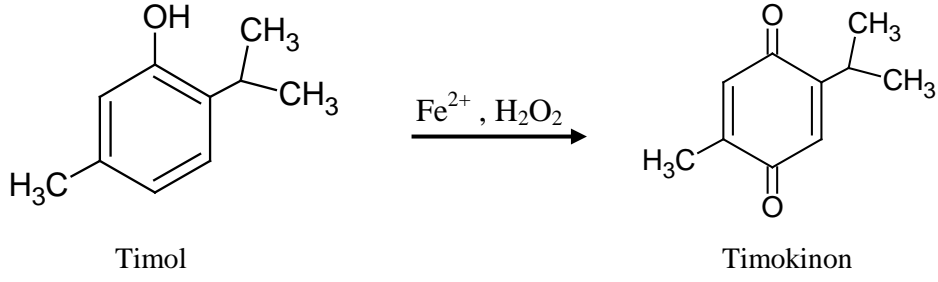


**Şekil 4.2.2.2.** Karvakrolden timokinon oluşum reaksiyonu

Timol çözeltisinin Fenton reaksiyonu öncesi ve 10 dk sonrası HPLC ile kromatografik analizi yapılmıştır. Fenton reaksiyonu sonrası timol miktarında azalma gözlenmiştir. Yan ürün olarak timokinon oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2.2.3.'de görülmektedir.

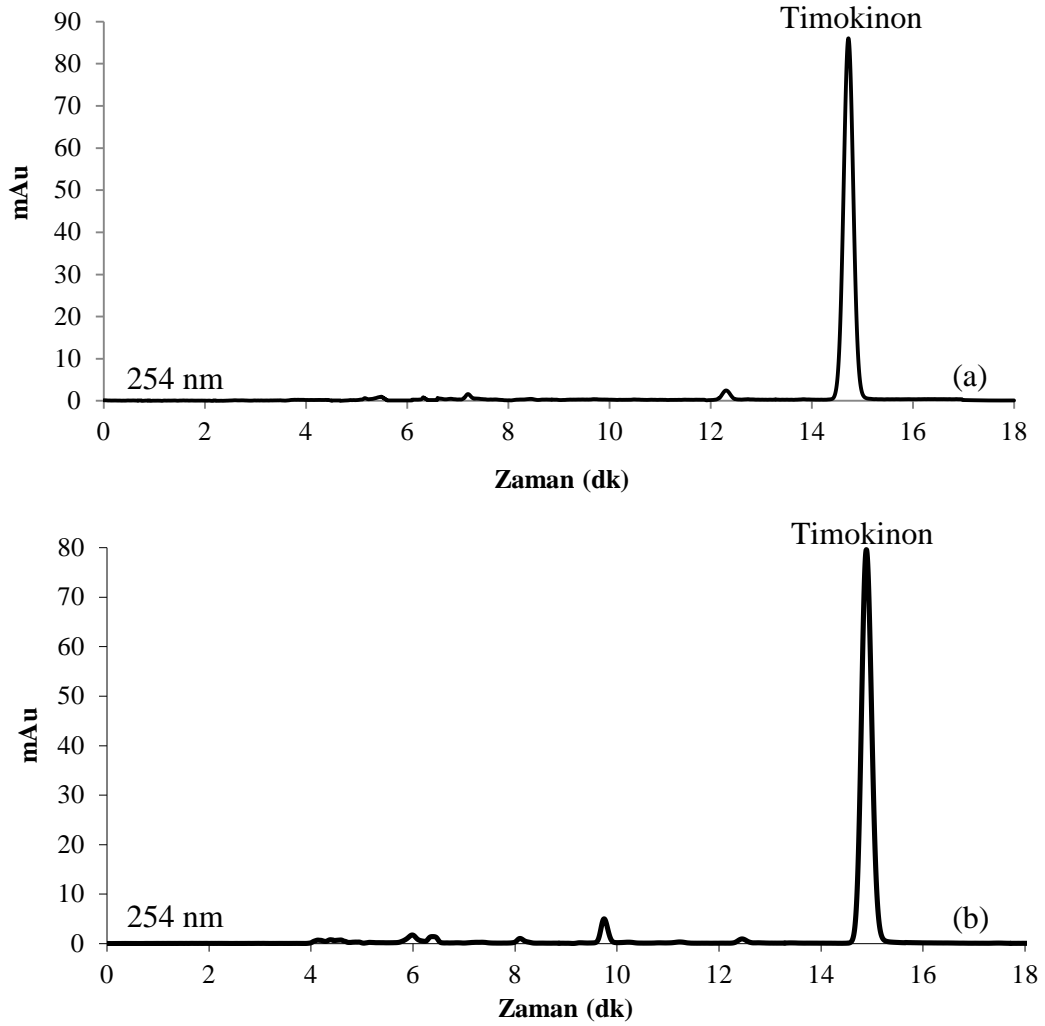


**Şekil 4.2.2.3. (a)** 400  $\mu$ M timol çözeltisinin kromatogramı  
**(b)** 400  $\mu$ M timol çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı



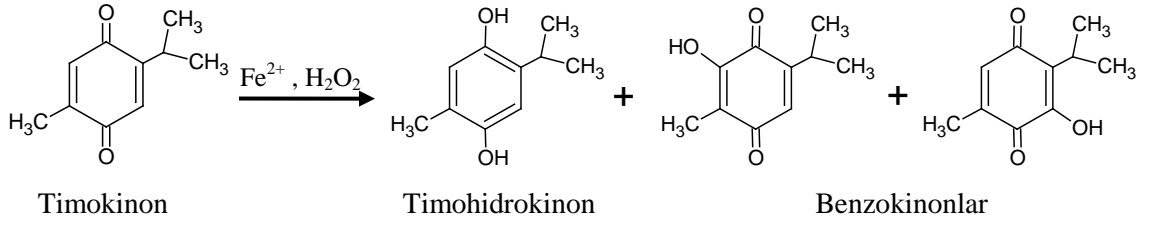
**Şekil 4.2.2.4.** Timolden timokinon oluşum reaksiyonu

Timokinon çözeltisinin Fenton reaksiyonu öncesi ve 10 dk sonrası HPLC ile kromatografik analizi yapılmıştır. Fenton reaksiyonu sonrası timokinon miktarında azalma gözlenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2.2.5.'de görülmektedir.



**Şekil 4.2.2.5. (a)** 40  $\mu$ M timokinon çözeltisinin kromatogramı

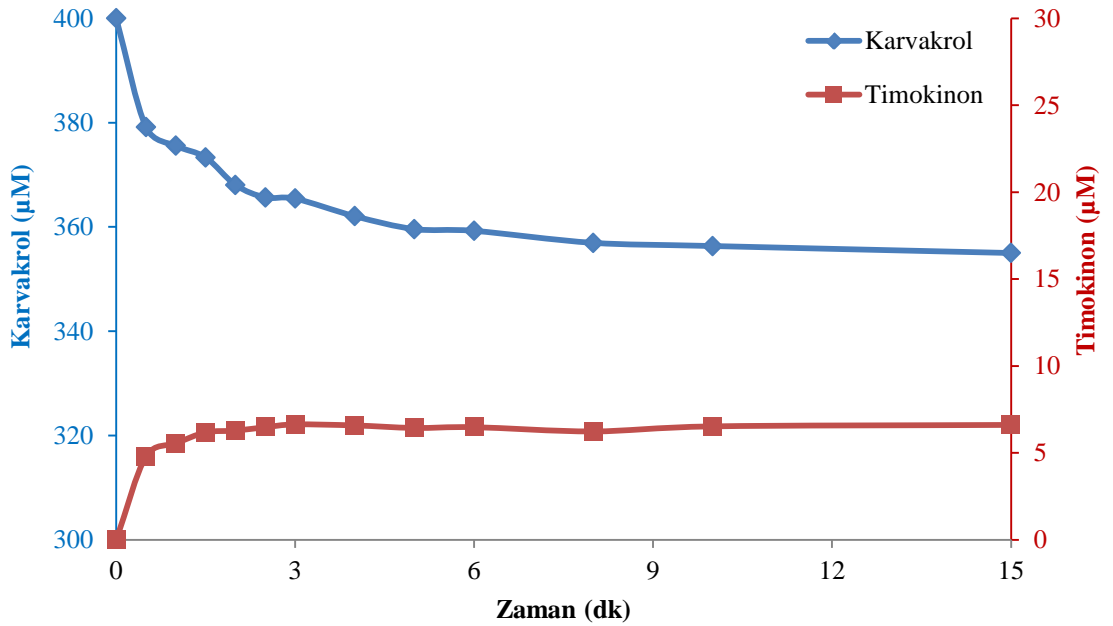
**(b)** 40  $\mu$ M timokinon çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası kromatogramı



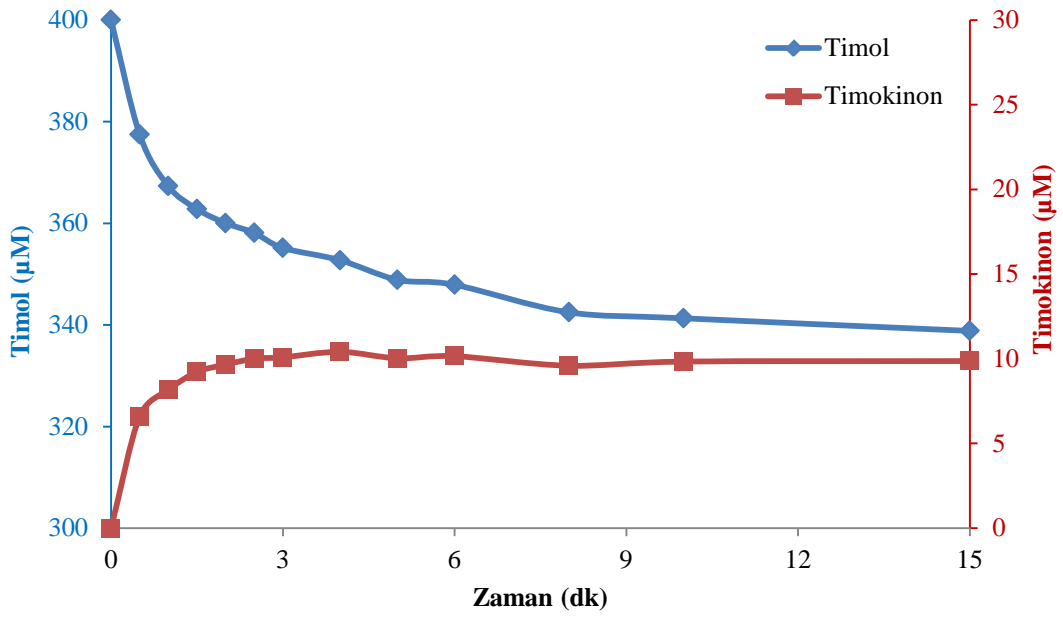
**Şekil 4.2.2.6.** Timokinondan timohidrokinon ve benzokinonların oluşumu

### 4.2.3. Karvakrol, timol ve timokinonun hidroksil radikalini süpürme kinetiği

Karvakrol ve timol çözeltilerinin Fenton reaksiyonu sonrası zamanla konsantrasyonlarındaki azalma ve oluşan timokinon miktarları Şekil 4.2.3.1. ve Şekil 4.2.3.2.'de verilmiştir. 400  $\mu\text{M}$  karvakrol 15 dakika sonunda 356  $\mu\text{M}$ 'a inmiştir ve 6,5  $\mu\text{M}$  timokinon oluşmuştur. 400  $\mu\text{M}$  timol 15 dakika sonunda 341  $\mu\text{M}$ 'a inmiştir ve 10  $\mu\text{M}$  timokinon oluşmuştur.

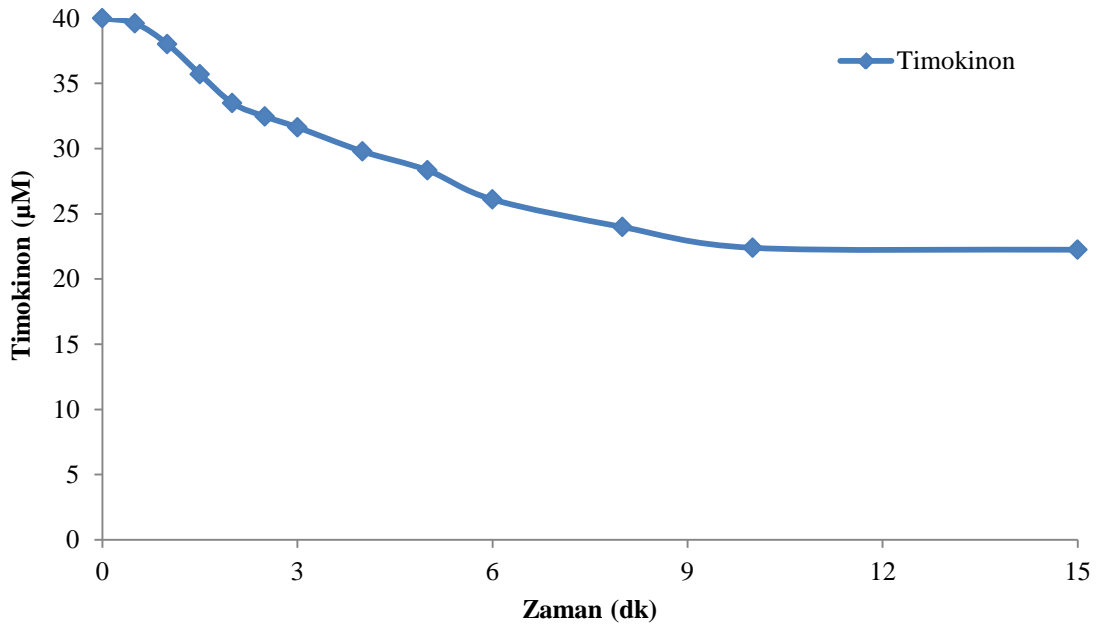


**Şekil 4.2.3.1.** 400  $\mu\text{M}$  karvakrolün Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (karvakrol = 400  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  = 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  = 100  $\mu\text{M}$ )



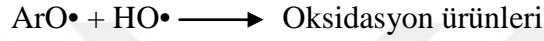
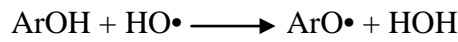
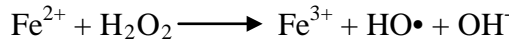
**Şekil 4.2.3.2.** 400 µM timolün Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (timol = 400 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 200 µM, Fe<sup>2+</sup> = 100 µM)

Timokinon çözeltisinin Fenton reaksiyonu sonrası zamanla konsantrasyonundaki azalma miktarı Şekil 4.2.3.3.'de verilmiştir. 40 µM timokinon 15 dakika sonunda 22 µM'a inmiştir.



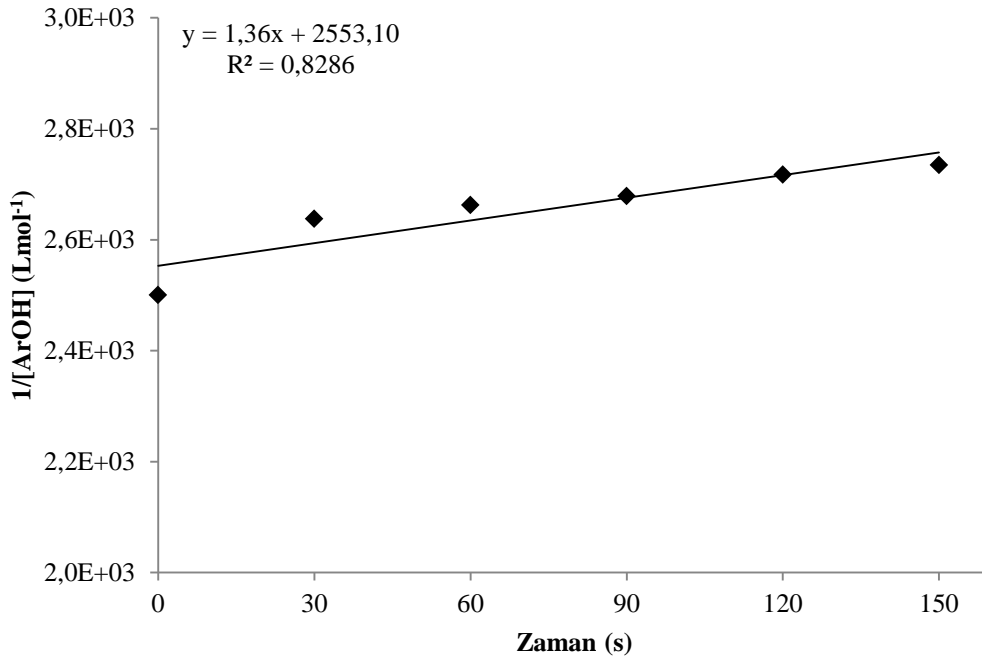
**Şekil 4.2.3.3.** 40 µM timokinonun Fenton reaksiyonu sonrası HPLC ile takibi (timokinon = 40 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 20 µM, Fe<sup>2+</sup> = 10 µM)

Antioksidanlar tarafından HO• radikalının süpürülmesi ile oksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Fenton reaksiyonu sonucu oluşan HO• radikali fenolik bileşikler (ArOH) ile iki farklı mekanizmayla reaksiyona girmektedir. (i) fenolik bileşikten hidrojen atomu çıkarılması ve (ii) antioksidandan (ArOH) veya antioksidan oluşan fenoksit anyonundan (ArO<sup>-</sup>) HO• radikaline elektron transferi. Fenton reaksiyonu ile hızlı bir şekilde meydana gelen HO• radikali ortamdaki fenolik bileşikler tarafından da hızlı bir şekilde süpürülür.

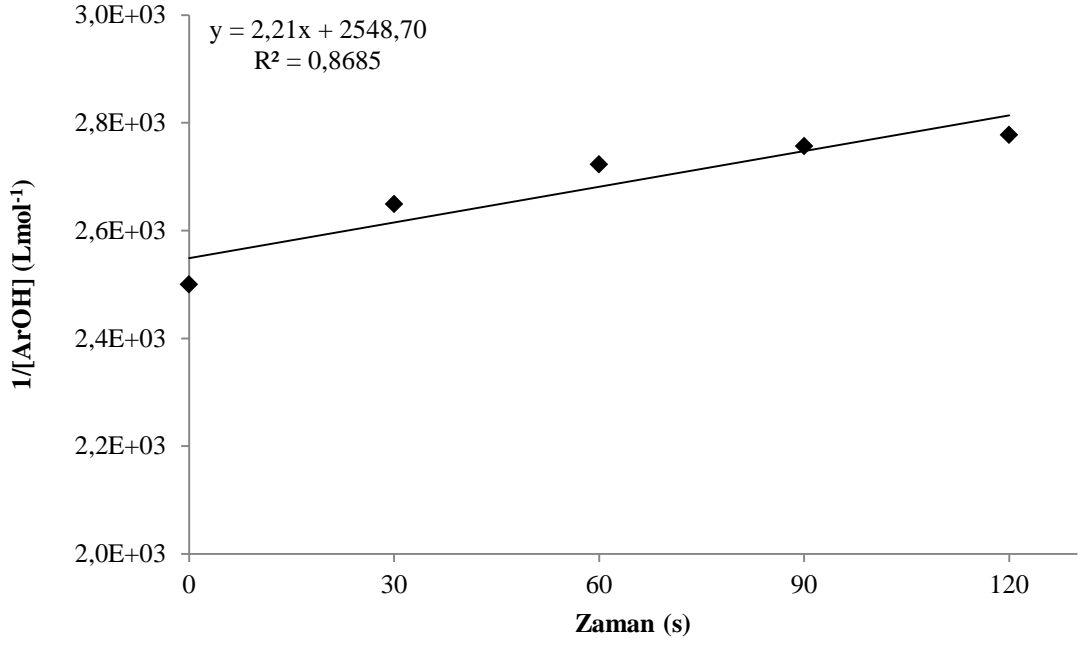


Elde edilen HPLC verilerinden karvakrol, timol ve timokinona ait ikinci dereceden hız denklemleri türetilmiştir. Reaksiyon hız sabitlerini belirlemek için 1/[ArOH] değerine karşılık zaman grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.2.3.4., Şekil 4.2.3.5., Şekil 4.2.3.6.).

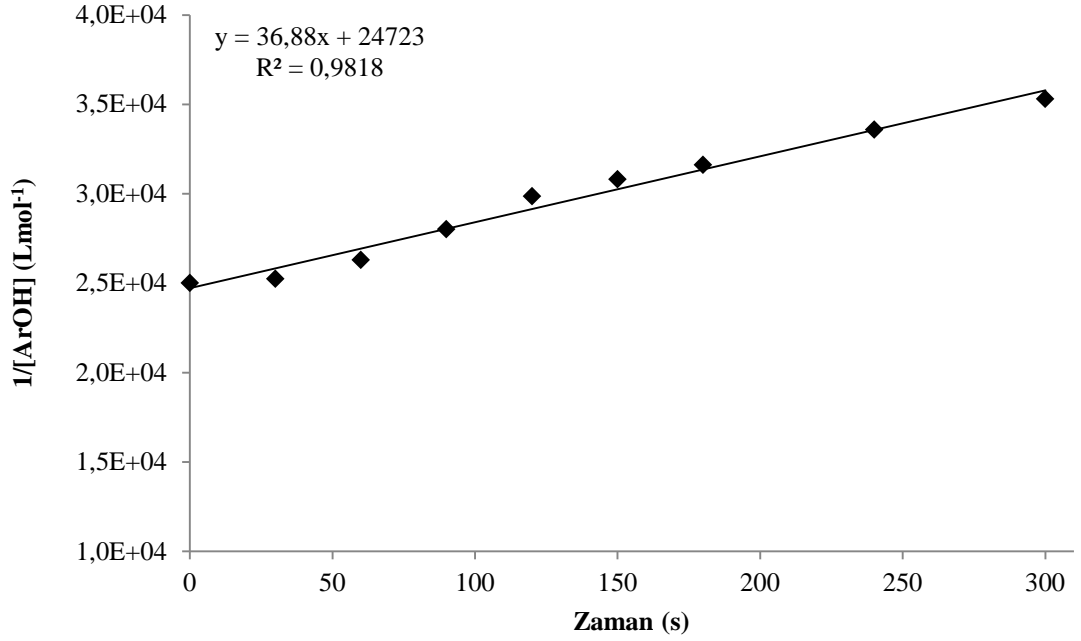
$$\frac{1}{[\text{ArOH}]_t} = kt + \frac{1}{[\text{ArOH}]_0}$$



**Şekil 4.2.3.4.** Karvakrolün oksidasyonunun ikinci derece kinetik grafiği



Şekil 4.2.3.5. Timolün oksidasyonun ikinci derece kinetik grafiği



Şekil 4.2.3.6. Timokinonun oksidasyonun ikinci derece kinetik grafiği



Karvakrol, timol ve timokinon için çizilen ikinci derece kinetik grafiklerinden yararlanarak her bir fenolik maddenin oksidasyonu için hız sabiti ve yarılanma süresi belirlenmiştir (Çizelge 4.2.3.1.). Hız sabitleri  $k=k_{gözlenen}/[ArOH]_0$  formülünden hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.2.3.1.** Karvakrol, timol ve timokinona ait hız sabiti ve yarılanma süreleri

	<b>k</b> (Lmol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	<b>t<sub>1/2</sub></b> (s)
Karvakrol	3,40.10 <sup>6</sup>	1838
Timol	5,52.10 <sup>6</sup>	1132
Timokinon	9,22.10 <sup>9</sup>	678

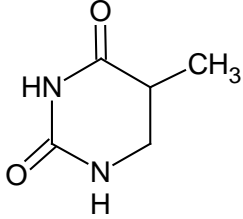
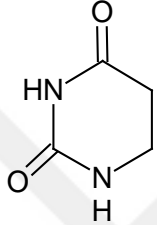
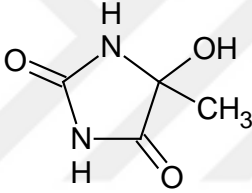
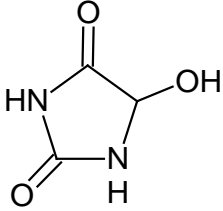
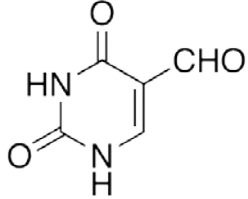
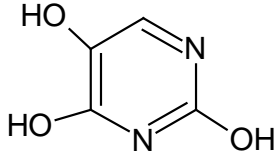
En yüksek hız sabiti timokinon için belirlenmiştir. Karvakrol, timol ve timokinon arasından Fenton reaksiyonu ile oluşturulan •OH radikalini süpürme hızı en yüksek olan molekül timokinondur. Daha sonra sırasıyla timol ve karvakrol gelmektedir. 400 µM karvakrol, timol ve timokinon çözeltilerinin ABTS yöntemiyle antioksidan kapasiteleri sırasıyla 0,22, 0,28, 0,30 mg troloks/mL olarak bulunmuştur. •OH radikalini süpürme hızı en az olan karvakrolün antioksidan kapasite değeri de en az bulunmuştur. •OH radikalini süpürme hızı en fazla olan timokinonun antioksidan kapasite değeri de en fazla bulunmuştur.

### **4.3. DNA Oksidatif Baz Hasar Ürünlerinin GC-MS/MS ile Analizi için Metot Geliştirilmesi**

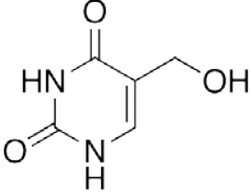
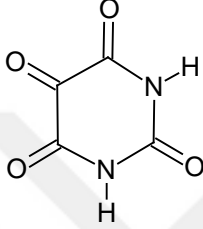
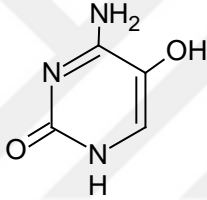
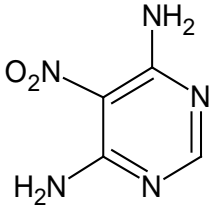
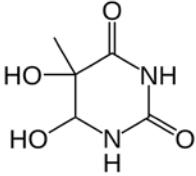
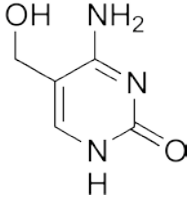
#### **4.3.1. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin analizi için GC-MS/MS çalışma koşullarının belirlenmesi**

Analiz edilecek her bir DNA oksidatif baz hasar ürünü %1 TMCS içeren BSTFA ile türevlendirildikten sonra GC-MS/MS enjeksiyonu yapılmıştır. Her bir madde için alıkonma zamanı, birinci iyonlaşma sonucu taranacak kütleler, ikinci iyonlaşma için gerekli enerji (collision enerji) ve ikinci iyonlaşma sonrası taranacak kütleler belirlenmiştir. Elde edilen veriler çizelge 4.3.1.1. de verilmiştir. 18 farklı DNA oksidatif baz hasar ürününün tayini için gerekli parametreler belirlenerek GC-MS/MS analiz programı oluşturulmuştur.

**Çizelge 4.3.1.1.** DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS verileri

Molekül	Alıkonma zamanı (dk)	Kütle spektrumu değerleri		
		m/z <sub>1</sub>	m/z <sub>2</sub>	Enerji (eV)
 <p>5,6-dihidrotimin (5,6DHT)</p>	4,79	271,1	113,0	18
		271,1	255,1	10
 <p>5,6-dihidrourasil (5,6DHU)</p>	4,81	257,1	241,1	10
		257,1	99,1	16
 <p>5-hidroksi-5-metil-hidantoin (5H5MH)</p>	4,94	331,1	73,1	20
		331,1	172,2	10
 <p>5-hidroksi hidantoin (5HH)</p>	5,17	189,1	147,2	8
		202,1	75,1	12
 <p>5-formilurasil (5FU)</p>	5,95	269,0	73,1	18
		269,0	143,1	10
 <p>5-hidroksiurasil (5HU)</p>	6,22	329,1	241,1	10
		329,1	157,1	24

**Çizelge 4.3.1.1.(devam)** DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS verileri

Molekül	Alıkonma zamanı (dk)	Kütle spektrumu değerleri		
		m/z <sub>1</sub>	m/z <sub>2</sub>	Enerji (eV)
 <p>5-hidoksimetil urasil (5HMU)</p>	7,33	343,1 358,2	147,1 357,2	20 10
 <p>Alloksan (Alx)</p>	7,39	331,1 331,1	73,1 172,2	18 10
 <p>5-hidroksisitozin (5HC)</p>	7,57	328,2 343,2	240,2 342,3	10 10
 <p>4,6-diamino-5-nitropirimidin (4,6D5NP)</p>	7,74	240 285	158,1 240,1	14 10
 <p>Timin glikol (TG)</p>	8,20	259,1 259,1	116,1 101,1	8 12
 <p>5-hidroksi metilsitozin (5HMC)</p>	8,34	357,2 357,2	356,3 254,2	8 8

**Çizelge 4.3.1.1.(devam)** DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS verileri

Molekül	Alıkonma zamanı (dk)	Kütle spektrumu değerleri		
		m/z <sub>1</sub>	m/z <sub>2</sub>	Enerji (eV)
<p>4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin (FapyAde)</p>	9,76	280,1	73,1	22
		280,1	264,2	10
<p>8-hidroksiadenin (8HA)</p>	11,29	367,2	352,3	10
		352,2	264,2	12
<p>2-hidroksiadenin (2HA)</p>	12,47	352,13	264,2	17
		352,19	130,1	26
<p>2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua)</p>	12,70	457,2	442,3	10
		457,2	368,3	12
<p>2,8-dihidroksi adenin (28DHA)</p>	13,50	440,2	424,2	10
		455,2	440,2	10
<p>8-hidroksi-2-deoksiguanin (8HG)</p>	14,01	440,2	147,1	20
		455,3	440,3	12

### 4.3.2. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin türevlendirilmesinin kemometrik optimizasyonu

DNA baz hasar ürünlerinin türevlendirilerek analizi için literatürde farklı türevlendirme protokolleri bulunmaktadır. 18 farklı hasar ürününün aynı anda analizi için ortak bir türevlendirme prosedürünün kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle, DNA oksidatif baz ürünlerinin analizini en iyi şekilde yapabilmek için türevlendirme koşulları kemometrik olarak optimize edilmiştir. Bunun için 5 seviyeli 3 prametreli, 18 deneyden oluşan çok yanıtli merkezi kompozit dizayn tasarlanmıştır. Türevlendirme işlemine, türevlendirme süresi, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirici/çözelti oranının etkisi incelenmiştir. İncelenen parametreler ile bu parametreler için seçilen kodlanmış ve gerçek değerler çizelge 4.3.2.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.2.1.** Merkezi kompozit dizaynda kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler

Kodlanmış değer	Türevlendirme süresi (dk)	Türevlendirme sıcaklığı (°C)	Türevlendirici/çözelti oranı (h/h)
-1,732	14,4	68	0,362
-1	40	90	0,667
0	75	120	1,083
1	110	150	1,500
1,732	135,6	172	1,805

Oluşturulan 18 deneylik dizayna uygun olarak yapılan deneyler sonucu seçilen her biri 1,0 mg/L derişimde 6 farklı DNA oksidatif baz hasar ürünü için pik alanları alınmıştır. Üçü pürin (5,6-dihidrotimin, 5-formilurasil, 5-hidroksimetilurasil), üçü pirimidin (4,6-dimino-5-nitropirimidin, 4,6-diamino-5-formilamidopirimidin, 8-hidroksiguanin) yapısındaki baz hasar ürünleri seçilerek çok yanıtli merkezi kompozit dizayna uygun olarak işlemler gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan deneysel dizayn çizelge 4.3.2.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.2.2.** DNA oksidatif hasar ürünlerinin türevlendirilmesinin optimizasyonu için merkezi kompozit dizayn tablosu

Deney No	Parametreler					
	Kodlanmış değerler			Gerçek değerler		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Türev. süresi (dk)	Türev. sıcaklığı (°C)	Türev./çöz. oranı (h/h)
1	-1	-1	-1	40	90	0,667
2	1	-1	-1	110	90	0,667
3	-1	1	-1	40	150	0,667
4	1	1	-1	110	150	0,667
5	-1	-1	1	40	90	1,500
6	1	-1	1	110	90	1,500
7	-1	1	1	40	150	1,500
8	1	1	1	110	150	1,500
9	-1,732	0	0	14,4	120	1,083
10	1,732	0	0	135,6	120	1,083
11	0	-1,732	0	75	68	1,083
12	0	1,732	0	75	172	1,083
13	0	0	-1,732	75	120	0,362
14	0	0	1,732	75	120	1,805
15	0	0	0	75	120	1,083
16	0	0	0	75	120	1,083
17	0	0	0	75	120	1,083
18	0	0	0	75	120	1,083

Çizelge 4.3.2.2.'deki deneysel dizayn tablosu kullanılarak yapılan türevlendirmeler sonucu alınan pik alanları kullanılarak Design Expert 7.1.4. programı ile model denkleminin oluşturulmasında kullanılacak b katsayıları hesaplanmıştır.

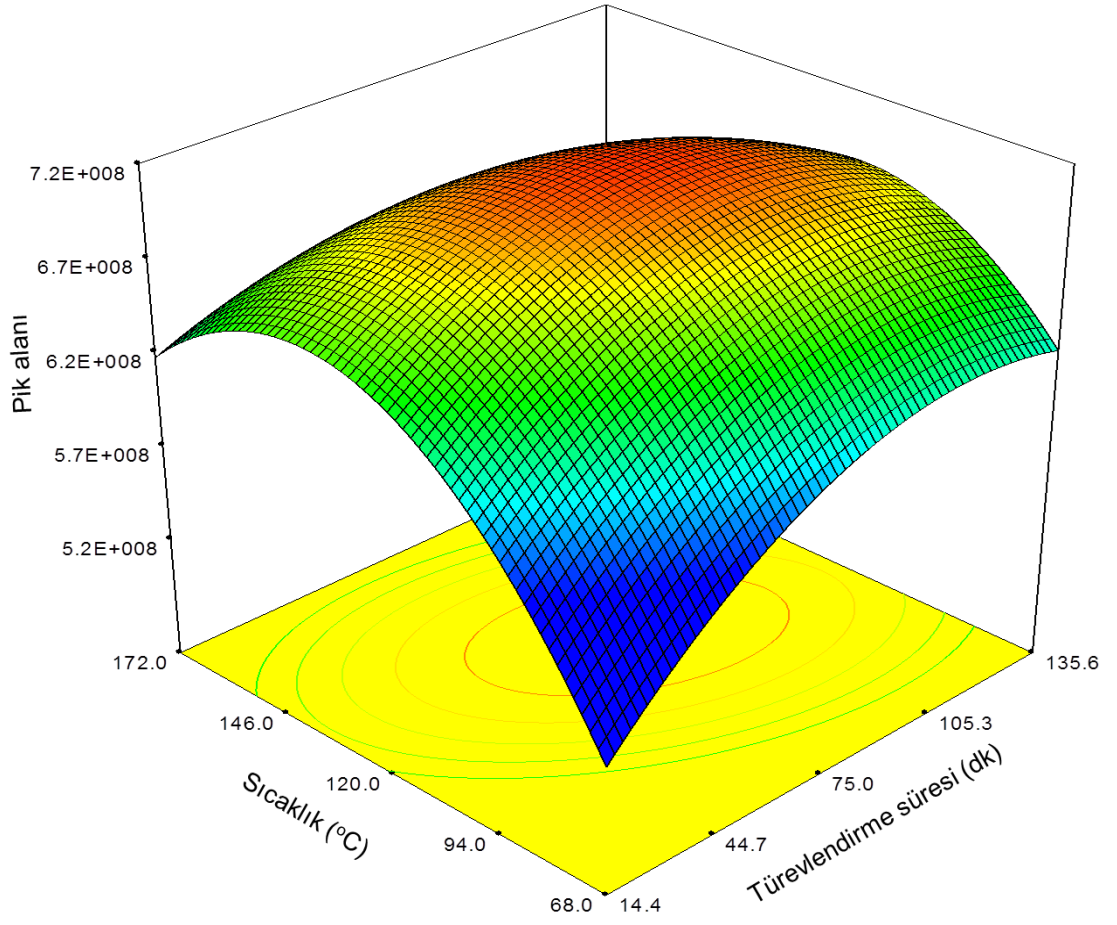
Her bir DNA oksidatif baz hasar ürününü için modelin uygunluğunu ve hangi parametrelerin önemli olduğunu belirlemek amacıyla varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. ANOVA sonuçlarına göre, *p* değeri 0,05'den küçük olan parametreler

önemli, büyük olan parametreler önemsiz kabul edilmiştir. Buna göre oluşturulan yeni model denklemleri çizelge 4.3.2.3.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.2.3.** Önemli parametrelere göre oluşturulan model denklemleri

DNA oksidatif baz hasar ürünü	Model denklemi
5,6DHT	$y = 1,432.10^7 - 1,223.10^6 x_1 - 3,909.10^6 x_2 + 8,535.10^5 x_3 - 1,634.10^6 x_1 x_2 - 1,906.10^6 x_2^2 - 1,074.10^6 x_3^2$
5FU	$y = 2,766.10^7 - 1,097.10^6 x_1 - 1,993.10^6 x_2 + 4,765.10^6 x_3 - 1,545.10^6 x_1 x_2 - 1,660.10^6 x_3^2$
5HMU	$y = 6,078.10^7 + 1,761.10^6 x_1 + 1,957.10^6 x_2 + 3,155.10^6 x_3 + 1,544.10^6 x_2 x_3 - 7,185.10^5 x_2^2 - 2,648.10^6 x_3^2$
46D5NP	$y = 2,821.10^7 + 1,005.10^6 x_1 + 1,279.10^6 x_2 + 2,612.10^6 x_3 - 1,127.10^6 x_3^2$
FapyAde	$y = 1,034.10^8 - 3,681.10^6 x_2 + 7,886.10^6 x_3 - 4,071.10^6 x_2^2 - 4,914.10^6 x_3^2$
8HG	$y = 2,093.10^6 + 7,573.10^4 x_1 + 1,771.10^5 x_2 + 3,614.10^5 x_3 - 2,297.10^5 x_3^2$

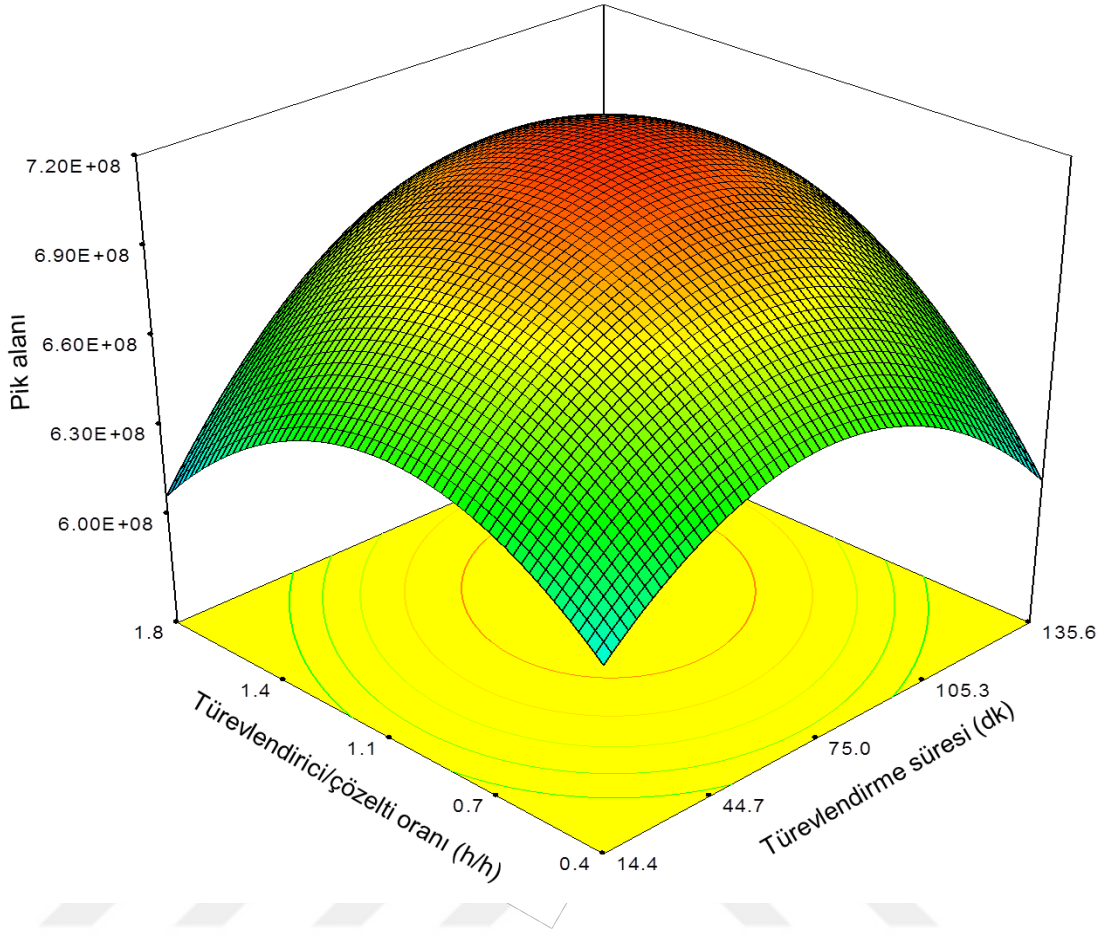
$x_1-x_2$  (türevlendirme süresi–sıcaklık),  $x_1-x_3$  (türevlendirme süresi–türevlendirici/çözücü oranı),  $x_2 - x_3$  (sıcaklık–türevlendirici/çözücü oranı) parametreleri arasında üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri çizilerek incelenen parametrelerin pik alanı üzerine etkileri Şekil 4.3.2.1., 4.3.2.2. ve 4.3.2.3.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.2.1.** Türevlendirme süresi ile sıcaklık ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

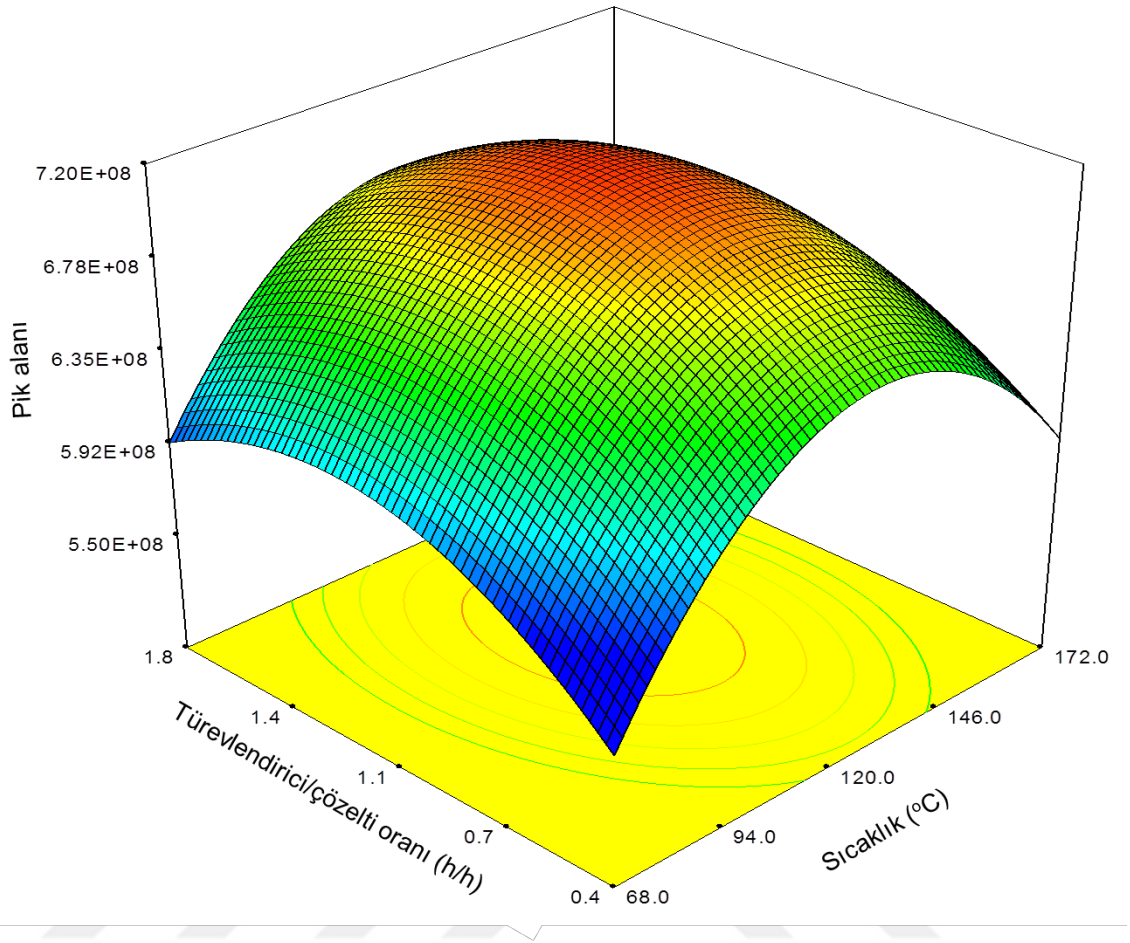
Grafiğe göre pik alanı, türevlendirme süresi azaldıkça ve sıcaklık en düşük ve en yüksek değerlere kaydıkça azalmaktadır.





**Şekil 4.3.2.2.** Türevlendirme süresi ile türevlendirici/çözücü oranı ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

Grafiğe göre, türevlendirici/çözücü oranının orta değerleri ile türevlendirme süresinin orta değerlerinde pik alanı en yüksek değerlere ulaşmaktadır.



**Şekil 4.3.2.3.** Sıcaklık ile türevlendirici/çözelti oranı ve karşılıklı etkileşimlerinin pik alanı üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

Grafiğe göre sıcaklık 120 °C civarındayken, türevlendirici/çözelti oranı en düşük ve en yüksek değerlere yaklaştıkça pik alanı azalmaktadır.

Oluşturulan model denklemlerine göre Design Expert 7.1.4. programı kullanılarak her bir parametre için optimum değer belirlenmiştir. Belirlenen optimum değerler çizelge 4.3.2.4.'de görülmektedir.

**Çizelge 4.3.2.4.** DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin türevlendirilmesi için optimum değerler

	<b>Türevlendirme süresi (dk)</b>	<b>Türevlendirme sıcaklığı (°C)</b>	<b>Türevlendirici/çözelti oranı (h/h)</b>
<b>Optimum değer</b>	40	120	1,4

DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin türevlendirilmesi için literatürde kullanılan değerler, 30 dk türevlendirme süresi, 120 °C türevlendirme sıcaklığı ve 1,0 türevlendirici/çözelti oranıdır (Reddy ve ark. 2004). 1,0 mg/L derşimdeki 11 tane DNA oksidatif baz hasar ürünü için literatürde belirtilen koşullarda hazırlanan numune ile belirlenen optimum koşullarda hazırlanan numuden elde edilen pik alanları karşılaştırılmıştır. Her bir DNA oksidatif baz hasar ürünü için pik alanındaki değişim Çizelge 4.3.2.5.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.2.5.** DNA oksidatif baz hasar ürünleri için pik alanındaki değişim

<b>DNA oksidatif baz hasar ürünü</b>	<b>Pik alanı % değişim</b>
56DHT	24,3
56DHU	22,9
5H5MH	16,9
5HH	9,9
5FU	29,5
5HMU	21,0
Alx	-12,6
46D5NP	20,2
FapyAde	17,3
2HA	76,4
8HG	30,1

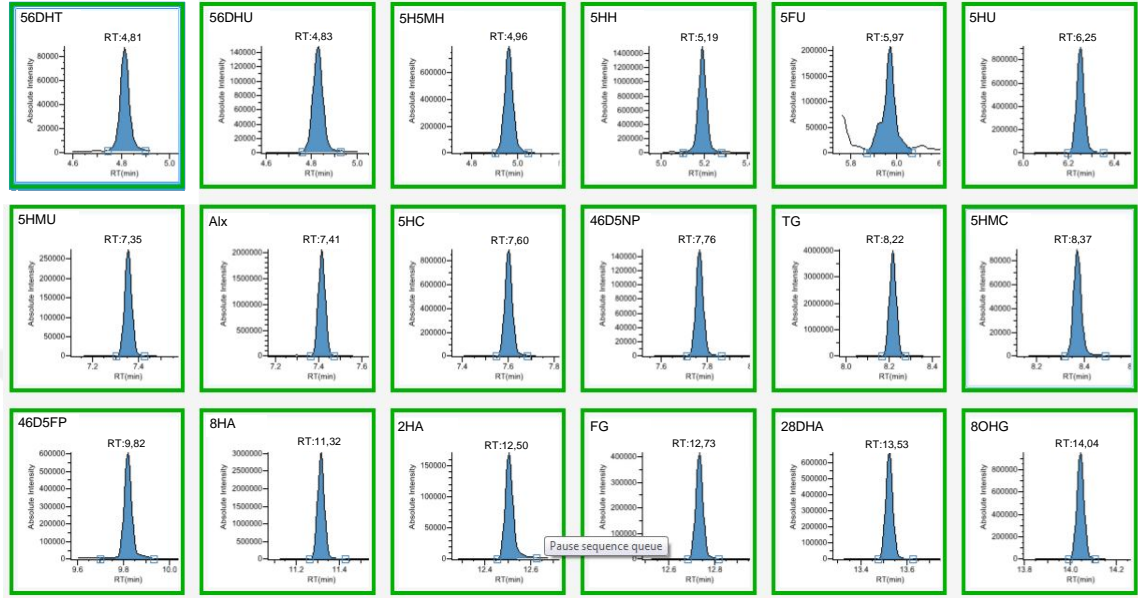
### 4.3.3. DNA oksidatif baz hasar ürünleri için validasyon parametreleri

DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile analizi için geliştirilen metodun validasyon parametreleri belirlenmiştir. Her bir hasar ürünü için kalibrasyon grafiği denklemi regresyon katsayısı ve kalibrasyon grafiğinin çizildiği doğrusal aralık Çizelge 4.3.3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.3.1.** DNA oksidatif baz hasar ürünleri için kalibrasyon grafiği denklemleri ve çalışılan doğrusal aralık değerleri

Molekül	Kalibrasyon denklemi	Regresyon katsayısı (R <sup>2</sup> )	Doğrusal aralık (µg/L)
56DHT	$y = 16646x + 18767$	0,9999	0,25–200
56DHU	$y = 29866x + 26116$	0,9999	0,25–200
5H5MH	$y = 139484x + 40828$	0,9995	0,25–200
5HH	$y = 332926x + 456151$	0,9999	0,10–200
5FU	$y = 37526x + 182000$	0,9985	0,50–200
5HU	$y = 180247x - 71952$	0,9983	0,25–200
5HMU	$y = 35141x + 5368$	0,9997	0,05–200
AIx	$y = 403716x - 448535$	0,9985	0,10–200
5HC	$y = 234156x - 344006$	0,9969	0,10–200
46D5NP	$y = 25379x - 19999$	0,9978	0,50–200
TG	$y = 650289x + 807385$	0,9966	0,10–200
5HMC	$y = 12495x - 2449$	0,9991	0,10–200
FapyAde	$y = 123507x + 139198$	0,9998	0,10–200
8HA	$y = 204511x + 825496$	0,9918	0,10–200
2HA	$y = 8172x + 55630$	0,9104	0,25–200
FapyGua	$y = 99348x - 214935$	0,9962	0,25–200
28DHA	$y = 63055x - 139448$	0,9976	0,50–400
8HG	$y = 82775x + 2508$	0,9874	0,10–25

Kalibrasyon grafikleri oluşturulurken yapılan analizlerden 18 adet DNA baz hasar ürününü 10 µg/L konsantrasyonda içeren numuneye ait GC-MS/MS kromatogramı Şekil 4.3.3.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.3.3.1. 10 µg/L konsantrasyondaki 18 adet DNA baz hasar ürünü standardının GC-MS/MS kromatogramı

DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin her biri için tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri Çizelge 4.3.3.2.'de verilmiştir. LOD ve LOQ değerleri her bir baz hasar ürünü için kalibrasyon grafiğindeki en düşük noktada tekrarlanan ölçümlerin standart sapmalarının hesaplanması ile belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.3.2.** DNA oksidatif baz hasar ürünleri için tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ) ve tekrarlanabilirlik değerleri

Molekül	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Analiz edilen en küçük madde miktarı <sup>a</sup> (fmol)	Tekrarlanabilirlik (%BSS)		% Geri kazanım
				Gün içi <sup>b</sup>	Günler arası <sup>c</sup>	
56DHT	76	254	0,78	0,30	6,93	105
56DHU	69	232	0,88	1,17	5,66	105
5H5MH	37	125	0,77	0,38	8,39	109
5HH	28	93	0,34	1,57	3,20	108
5FU	145	485	1,43	0,53	10,07	77
5HU	17	58	0,78	4,83	11,48	103
5HMU	8	26	0,14	5,92	7,49	118
AIx	11	35	0,28	2,63	11,84	98
5HC	25	83	0,31	1,31	8,07	106
46D5NP	89	297	1,29	1,30	4,40	104
TG	16	52	0,25	1,83	9,54	113
5HMC	24	80	0,28	1,22	7,76	118
FapyAde	31	102	0,26	1,28	5,71	103
8HA	28	92	0,26	5,68	8,26	103
2HA	76	253	0,66	5,71	11,61	129
FapyGua	26	86	0,59	2,40	8,69	118
28DHA	142	472	1,20	4,06	6,10	83
8HG	30	99	0,24	3,37	7,27	82

<sup>a</sup>: Kalibrasyon grafiğinin en düşük konsantrasyon noktası için GC-MS/MS'e enjekte edilen maddenin mol sayısıdır.

<sup>b</sup>: 10 µg/L konsantrasyondaki çözeltinin aynı gün yapılan 3 ölçüm değerinin bağıl standart sapmasıdır (N=3).

<sup>c</sup>: 10 µg/L konsantrasyondaki çözeltinin her gün yapılan 3 ölçümün (n=3) 3 gün tekrar edilmesiyle elde edilen değerlerin bağıl standart sapmasıdır (N=9).

DNA oksidatif baz hasar ürünleri yapılan metot geliştirme sayesinde çok düşük miktarlarda tayin edilebilmiştir. En düşük tayin limitine 30 ng/L ile 5-hidroksimetil urasil molekülü için inilebilmiştir. En yüksek tayin limiti de 480 ng/L ile 5-formilurasile aittir. Literatürdeki çalışmalarda tayin edilen en küçük miktar enjeksiyon yapılan hacmin içerdiği mol sayısı ile verilmektedir. Jaruga ve ark.'nın (2008) yaptığı çalışmada 4,6-diamino-5-formilamidopirimidin (FapyAde) ve fapyguanin (FapyGua) için tayin edilen en küçük madde miktarı ~1 fmol olarak vermiştir. Yaptığımız çalışmada aynı moleküller için tayin edilen en küçük madde miktarı sırasıyla 0,26 ve 0,59 fmol olarak bulunmuştur.

#### **4.4. Buzağı Timüs DNA'sı ile Yapılan Çalışmalar**

Buzağı timüs DNA ile yapılan çalışmalarda hiçbir işlem yapılmamış DNA'nın içerdiği oksidatif baz hasar ürünleri analiz edilmiştir. Ayrıca, bu DNA'yı içeren çözeltiliye iki farklı konsantrasyonda karvakrol, timol ve timokinon eklendikten sonra yapılan analizler sonucunda bu antioksidanların DNA'daki hasarı arttırmadığı belirlenmiştir. Bu veriler Çizelge 4.4.1.'de görülmektedir. DNA üzerine antioksidan eklenmesi baz hasar ürünlerinin miktarlarında önemli değişikliklere yol açmamıştır.

**Çizelge 4.4.1.** 100 µg buzağı timüs DNA'sındaki ve üzerine antioksidan madde eklendiğindeki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

	Kontrol	400 µM K	400 µM T	400 µM Tq	40 µM K	40 µM T	40 µM Tq
<b>56DHT</b>	<LOD	0,23±0,07	0,65±0,21	0,32±0,01	<LOD	0,18±0,07	0,35±0,02
<b>56DHU</b>	<LOD	0,47±0,14	0,83±0,19	0,84±0,16	1,18±0,19	0,61±0,13	0,68±0,13
<b>5H5MH</b>	1,51±0,01	3,59±0,04	5,18±0,03	2,80±0,04	1,48±0,11	18,85±1,31	5,62±0,07
<b>5HH</b>	8,27±0,34	8,14±0,06	8,13±0,23	5,80±0,13	6,68±0,13	16,01±0,41	8,07±0,10
<b>5FU</b>	4,62±0,32	21,42±1,66	15,14±1,61	24,91±2,72	25,17±2,27	3,21±0,18	12,76±1,20
<b>5HU</b>	0,19±0,08	4,86±0,34	2,73±0,28	0,81±0,14	0,76±0,16	2,48±0,04	0,45±0,06
<b>5HMU</b>	0,49±0,03	4,67±0,89	6,63±0,72	2,87±0,11	3,86±0,31	5,28±0,41	3,16±0,36
<b>Alx</b>	0,31±0,07	0,29±0,01	0,60±0,05	0,22±0,02	0,30±0,01	1,19±0,04	0,42±0,01
<b>5HC</b>	1,84±0,19	2,36±0,37	6,52±0,27	2,10±0,16	4,09±0,39	3,03±0,14	4,92±0,15
<b>46D5NP</b>	18,81±2,91	0,62±0,02	1,28±0,14	0,99±0,14	1,09±0,11	0,22±0,02	1,77±0,02
<b>TG</b>	0,17±0,02	0,39±0,01	0,42±0,02	0,36±0,01	0,12±0,01	0,93±0,10	0,42±0,01
<b>5HMC</b>	3,17±0,16	1,16±0,08	4,62±0,27	1,84±0,07	4,89±0,17	2,14±0,06	3,03±0,04
<b>FapyAde</b>	2,25±0,22	2,09±0,44	2,40±0,18	0,66±0,07	1,76±0,17	<LOD	0,46±0,14
<b>8HA</b>	1,95±0,37	1,85±0,41	5,52±0,89	1,92±0,32	3,05±0,35	0,08±0,01	1,07±0,12
<b>2HA</b>	7,05±0,33	2,56±0,55	6,36±0,86	5,44±0,27	6,04±0,22	1,20±0,02	2,05±0,08
<b>FapyGua</b>	0,16±0,03	<LOD	0,14±0,03	0,11±0,02	0,08±0,01	<LOD	0,48±0,02
<b>28DHA</b>	0,35±0,05	0,60±0,02	0,88±0,07	1,61±0,04	1,13±0,03	0,46±0,01	0,50±0,02
<b>8HG</b>	21,66±2,17	14,38±0,95	21,36±2,01	14,28±1,21	22,12±1,10	15,02±1,37	21,20±1,05
<b>TOPLAM</b>	72,80±3,71	69,68±2,32	89,39±3,02	67,88±3,03	83,80±2,64	70,89±2,01	71,41±1,67

<LOD: tespit limitinin altında

Buzağı timüs DNA'sına H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Fe<sup>2+</sup> eklenerek Fenton reaksiyonu oluşturulmuş ve DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin arttığı görülmüştür. Fenton reaksiyonu oluşturulmamış kontrol DNA numunesinde taranan 18 DNA baz hasar ürününden 16 tanesi tespit edilmiştir. Fenton reaksiyonu sonrası taranan tüm DNA baz hasar ürünleri tespit edilmiştir. Her bir hasar ürününün miktarında artış olmuştur ve hasar ürünlerinin toplamı 72,80 ng/mg DNA'dan 1952,42 ng/mg DNA'ya çıkmıştır. Karvakrol, timol ve



timokinon varlığında Fenton reaksiyonu gerçekleştirildiğinde DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin çok daha az miktarlarda oluştuğu görülmüştür (Çizelge 4.4.2.).

**Çizelge 4.4.2.** 100 µg buzağı timüs DNA'sında Fenton reaksiyonu ortamında ve antioksidan madde içeren ortamda oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

Antioks.	Kontrol	400 µM K	400 µM T	400 µM Tq	40 µM K	40 µM T	40 µM Tq
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
Fe <sup>2+</sup>	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
56DHT	2,05±0,34	2,35±0,37	1,89±0,20	2,55±0,38	1,57±0,42	1,34±0,06	0,93±0,04
56DHU	8,59±0,82	9,04±0,25	1,73±0,01	4,76±0,76	2,85±0,48	2,83±0,27	2,78±0,30
5H5MH	546,64±35,92	83,54±1,31	40,09±1,24	58,16±1,24	56,13±4,05	58,25±1,02	57,44±0,86
5HH	140,01±4,14	31,21±0,19	18,65±0,80	14,52±0,18	19,66±0,17	20,33±1,06	23,07±1,16
5FU	38,28±3,07	30,37±3,89	36,56±1,79	24,65±1,21	26,20±1,18	34,56±2,93	41,77±1,53
5HU	521,81±51,06	13,71±0,32	11,72±1,85	6,03±0,37	5,85±0,24	7,58±0,61	13,22±1,11
5HMU	187,47±6,26	43,07±0,56	27,64±0,38	15,22±0,26	43,79±3,28	47,47±1,73	38,49±1,55
Alx	17,93±1,14	3,84±0,03	1,61±0,11	0,94±0,06	2,71±0,18	3,55±0,11	2,02±0,13
5HC	18,13±0,20	8,71±0,15	6,15±0,14	6,90±0,10	5,75±0,35	7,00±0,30	8,39±0,18
46D5NP	1,16±0,23	0,43±0,04	0,43±0,06	0,26±0,03	0,47±0,02	0,64±0,04	0,50±0,01
TG	45,27±3,13	8,49±0,14	5,37±0,20	4,24±0,18	7,51±0,10	7,76±0,09	10,31±0,14
5HMC	21,38±0,62	12,68±0,52	5,16±0,20	3,36±0,18	7,58±0,10	8,65±0,59	8,53±0,76
FapyAde	1,70±0,16	2,03±0,21	1,81±0,14	0,11±0,02	1,20±0,16	1,78±0,28	1,50±0,14
8HA	126,92±9,34	44,29±1,31	25,86±0,17	22,87±2,35	31,53±1,43	36,23±1,24	41,38±1,41
2HA	171,93±11,52	90,81±7,84	69,08±5,71	61,11±5,10	69,29±4,82	71,37±5,41	77,94±2,77
FapyGua	3,37±0,05	0,11±0,01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28DHA	2,57±0,08	1,32±0,13	1,15±0,10	0,55±0,04	0,91±0,05	1,45±0,14	1,85±0,11
8HG	97,21±9,18	42,34±2,37	71,82±5,86	35,46±2,93	68,35±4,55	62,90±6,27	77,58±5,40
TOPLAM	1952,42±65,42	428,34±9,31	326,72±8,72	261,69±6,65	351,35±8,67	373,69±9,21	407,70±6,90

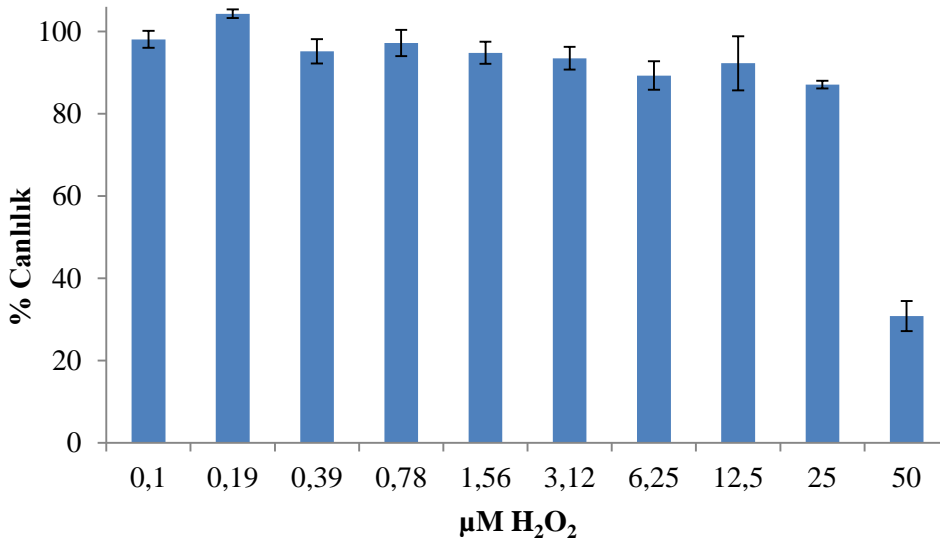
<LOD: tespit limitinin altında

Antioksidanların hasar oluşumunu engellemesi incelenirken, tayini yapılan 18 adet DNA oksidatif baz hasar ürünü de numunelerde gözlenmiştir. Sadece FapyGua molekülü Fenton reaksiyonu ve 400  $\mu\text{M}$  karvakrol içeren ortamdaki Fenton reaksiyonunda gözlenmiş, diğer numelerde gözlenmemiştir. Antioksidan içeren ortamda Fenton reaksiyonu gerçekleştirildiğinde DNA baz hasarı oluşumunda önemli azalma olmuştur. DNA bazlarını oksidatif hasara karşı en iyi 400  $\mu\text{M}$  timokinonun koruduğu belirlenmiştir.

#### 4.5. Malign (A549) ve Sağlıklı (BEAS-2B) Akciğer Hücresi ile Yapılan Çalışmalar

##### 4.5.1. Hücre kültürü ortamında toksik $\text{H}_2\text{O}_2$ dozunun belirlenmesi

Hücre DNA'sında oksidatif hasar oluşturmak amacıyla hücre kültürü ortamına eklenecek  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını tespit etmek için hücre kültürü ortamına farklı konsantrasyonlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendikten sonra hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. 0,1-50  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında elde edilen veriler Şekil 4.5.1.1.'de görülmektedir.

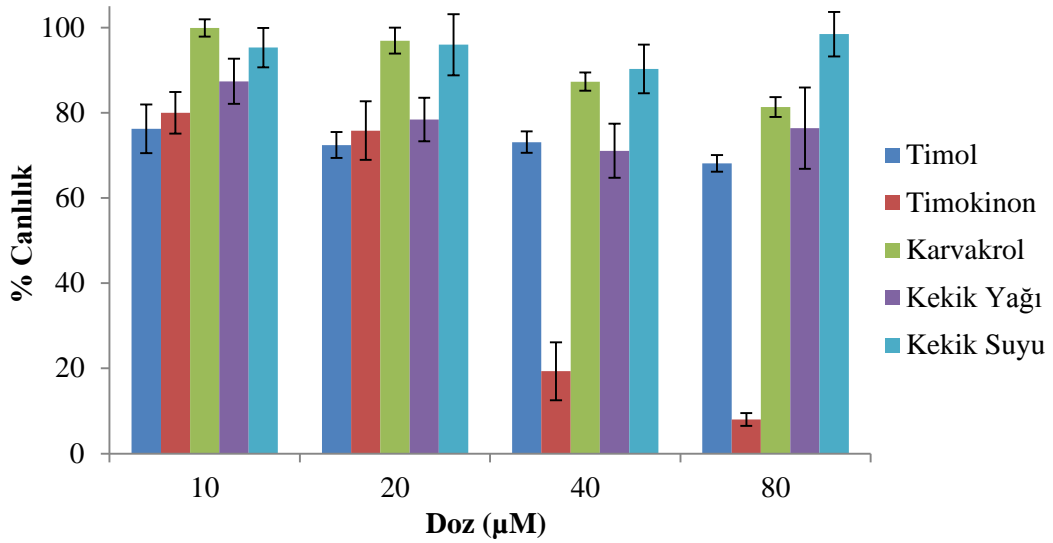


Şekil 4.5.1.1. Farklı  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları

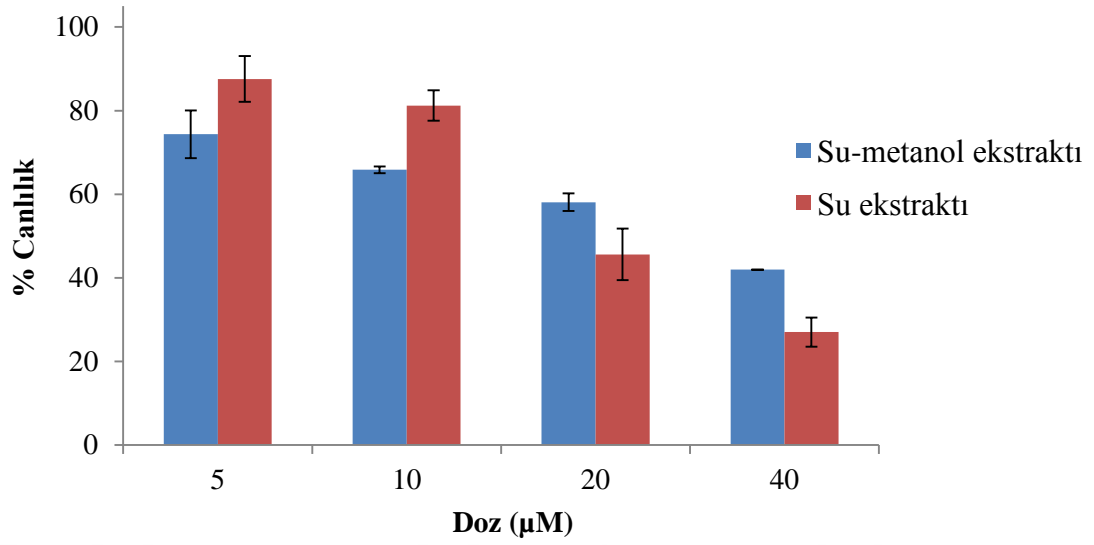
Yapılan çalışma sonucunda 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun hücrelerin yüksek oranda canlı kaldığı en yüksek konsantrasyon olduğu belirlenmiştir.

#### 4.5.2. Hücre kültürü ortamında antioksidanların toksik dozunun belirlenmesi

Hücre kültürü ortamına eklenecek antioksidanların miktarının belirlenmesi için hücre kültürü ortamına farklı konsantrasyonlarda antioksidan eklendikten sonra hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. Karvakrol, timol, timokinon, kekik yağı ve kekik suyu için 10-80  $\mu\text{M}$  aralığında, kekiğin su ve su-metanol ekstraktı için 5-40  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Bitkisel kaynaklı numunelerde belirtilen konsantrasyon numunenin en yüksek oranda içerdiği antioksidan maddenin konsantrasyonudur. Kekik suyu doğrudan, kekik yağı ve standart antioksidanlar dimetilsülfoksit ile çözülerek, ekstraktlar liyofilize edildikten sonra dimetilsülfoksit ile çözülerek kullanılmıştır. Karvakrol, timol, timokinon, kekik suyu ve kekik yağı için elde edilen veriler Şekil 4.5.2.1.'de, kekik su ekstraktı ve su-metanol ekstraktı için elde edilen veriler Şekil 4.5.2.2.'de görülmektedir.



**Şekil 4.5.2.1.** Karvakrol, timol, timokinon, kekik yağı ve kekik suyunun farklı konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları



**Şekil 4.5.2.2.** Farklı kekik ekstraktı konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin canlılık oranları

Yapılan denemeler sonucunda her bir antioksidan için hücre kültürü ortamına eklendiğinde hücrelerin canlılığına etki etmeyen en yüksek konsantrasyon belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar Çizelge 4.5.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.2.1.** Hücre kültürü ortamına eklenecek antioksidanların toksik olmayan konsantrasyonları

Antioksidan	Toksik olmayan konsantrasyon (µM)
Karvakrol	40
Timol	80
Timokinon	10
Kekik suyu	40
Kekik yağı	40
Su ekstraktı	5
Su-metanol ekstraktı	5

#### **4.5.3. Hücre kültürü ortamında oksidan ve antioksidan varlığının malign akciğer hücrelerinde (A549) DNA baz hasar ürünü miktarına etkisi**

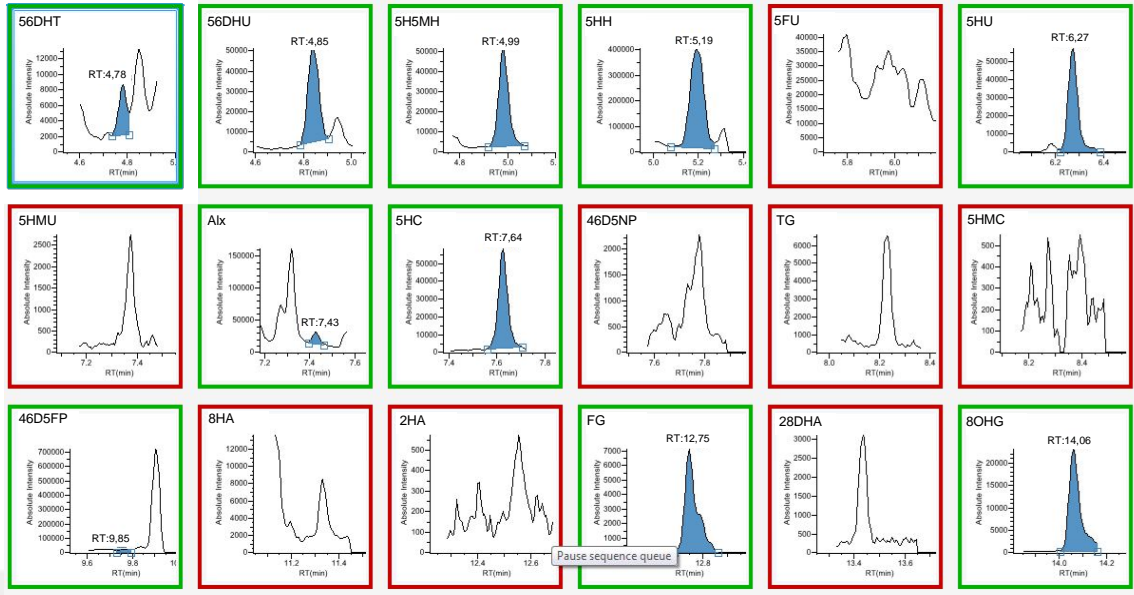
Malign akciğer hücresi (A549) kültür ortamına alınıp çoğalmaya başladıktan kontrol numunesine herhangi bir şey eklenmeden 72 saat kültüre edilmiştir. Oksidasyon için hücreler çoğalmaya başladıktan 24 saat sonra kültür ortamına 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenerek kültür işlemine 48 saat daha devam edilmiştir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenmemiş ortamdaki hücrelerden izole edilen DNA'ya göre  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendiğinde DNA baz hasar ürünlerinde artış gözlenmiştir (Çizelge 4.5.3.1.). Kontrol numunesinde taranan 18 DNA baz hasar ürününden 10 tanesi tespit edilmiş,  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki hücrelerin DNA'sında ise 15 baz hasar ürünü tespit edilmiştir. Ancak  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki DNA baz hasar ürünlerinin miktarındaki artış buzağı timüs DNA'sındaki kadar yüksek olmamıştır. Bunu nedeni eklenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in hücre çekirdeğine tamamen ulaşamaması, hücredeki antioksidan savunma sistemleri ile etkisiz hale getirilmesi ya da oluşan DNA hasarının hücredeki tamir mekanizmaları tarafından onarılması olabilir.

**Çizelge 4.5.3.1.** A549 hücre kültürü ortamında ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenen ve eklenmeyen hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

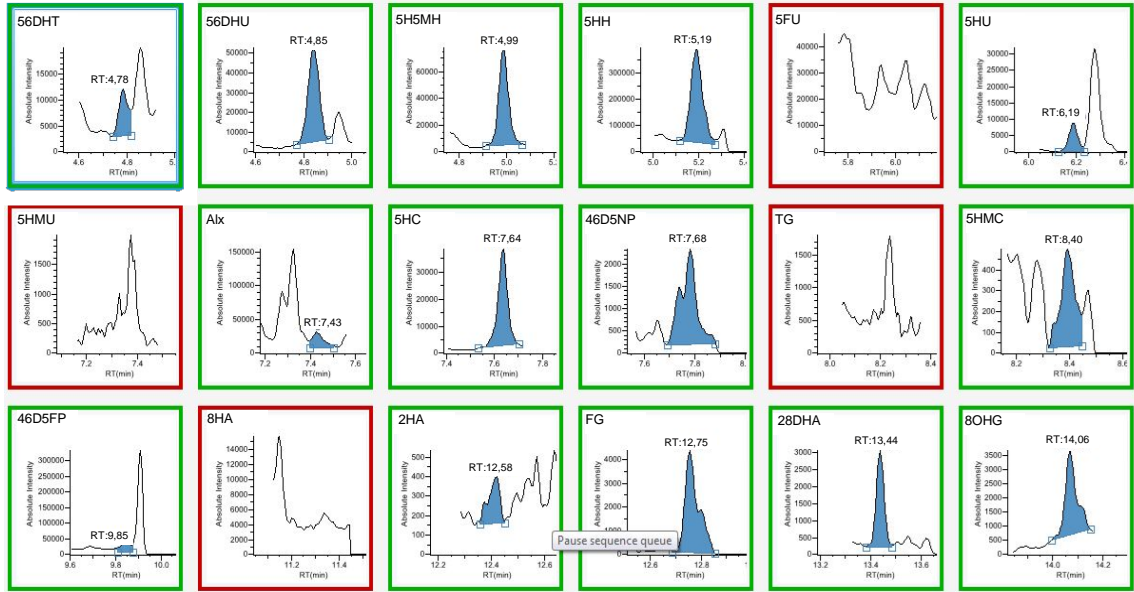
	<b>Kontrol</b>	<b>20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>56DHT</b>	0,13±0,01	0,59±0,03
<b>56DHU</b>	4,09±0,12	8,52±0,23
<b>5H5MH</b>	1,12±0,03	1,40±0,11
<b>5HH</b>	2,91±0,05	3,38±0,18
<b>5FU</b>	<LOD	<LOD
<b>5HU</b>	0,24±0,02	0,46±0,02
<b>5HMU</b>	<LOD	0,02±0,00
<b>Alx</b>	0,15±0,02	2,56±0,12
<b>5HC</b>	0,50±0,03	2,93±0,11
<b>46D5NP</b>	<LOD	1,46±0,05
<b>TG</b>	<LOD	<LOD
<b>5HMC</b>	<LOD	0,34±0,02
<b>FapyAde</b>	0,51±0,02	0,60±0,01
<b>8HA</b>	<LOD	<LOD
<b>2HA</b>	<LOD	0,28±0,02
<b>FapyGua</b>	3,20±0,21	3,16±0,20
<b>28DHA</b>	<LOD	0,71±0,05
<b>8HG</b>	0,49±0,10	1,86±0,11
<b>TOPLAM</b>	13,34±0,82	28,29±1,46

<LOD: tespit limitinin altında

Kontrol ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek hazırlanan hücrelerin DNA'sının GC-MS/MS analizine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.5.3.1. ve 4.5.3.2.'de görülmektedir.



**Şekil 4.5.3.1.** A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



**Şekil 4.5.3.2.** 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı

Antioksidanların hücre DNA'sını hasara karşı korumasının belirlenmesi için A549 hücreleri çoğalmaya başladıktan 24 saat sonra kültür ortamına antioksidanların belirlenen toksik olmayan dozlarından ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek kültür işlemine 48 saat daha devam edilmiştir. Antioksidan içeren ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek hasar oluşturulmaya çalışıldığında, antioksidan içermeyen ortama göre daha az DNA baz

hasar ürünü olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 4.5.3.2.). Oluşan DNA baz hasar ürünlerinin toplam miktarına bakıldığında, DNA bazlarını oksidatif hasara karşı en iyi koruyan standart antioksidan madde timokinon, bitkisel numune ise su-metanol ekstraktı olarak belirlenmiştir.

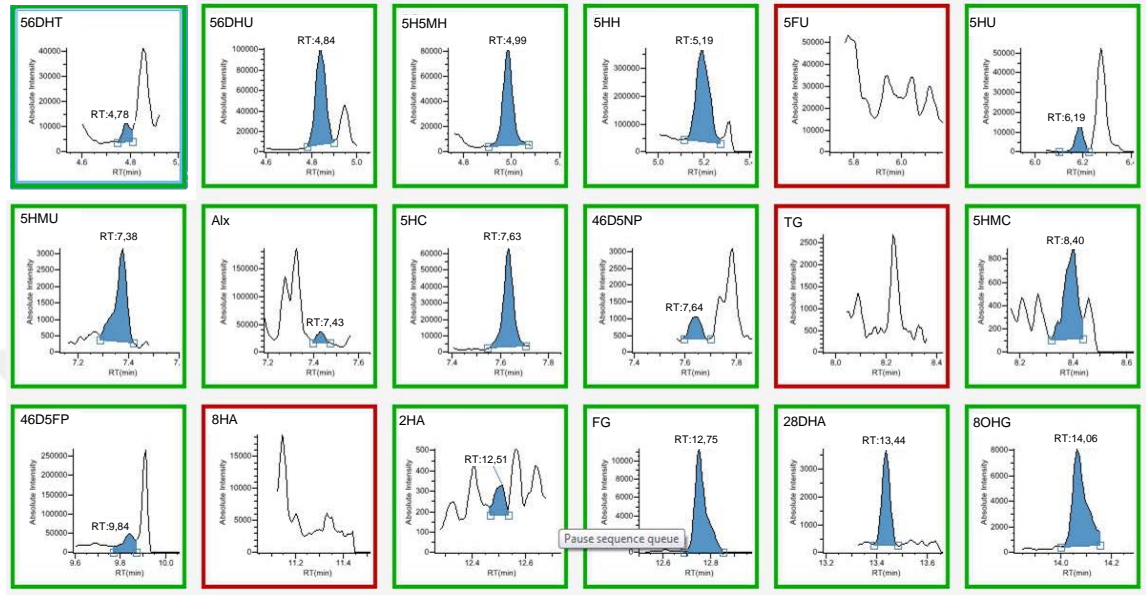
**Çizelge 4.5.3.2.** A549 hücre kültürü ortamında antioksidan varlığında 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendikten sonra hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

Antioks.	40 µM K	80 µM T	10 µM Tq	Kekik suyu	Kekik yağı	Su eks.	Su-met. eks.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM	20 µM
56DHT	0,36±0,02	0,36±0,03	<LOD	0,03±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
56DHU	5,20±0,19	5,95±0,21	4,34±0,19	4,67±0,21	4,57±0,22	5,99±0,36	4,24±0,30
5H5MH	1,29±0,12	1,29±0,14	1,06±0,09	0,97±0,02	0,93±0,03	1,25±0,09	1,10±0,09
5HH	2,78±0,09	1,99±0,10	1,03±0,08	1,59±0,06	1,99±0,11	2,84±0,21	1,67±0,15
5FU	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5HU	0,42±0,03	<LOD	<LOD	0,07±0,01	<LOD	<LOD	<LOD
5HMU	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	<LOD	0,03±0,01
Alx	1,80±0,05	1,80±0,07	1,71±0,11	1,86±0,10	1,80±0,09	1,71±0,11	1,76±0,12
5HC	0,61±0,05	0,53±0,04	0,42±0,03	0,49±0,03	0,52±0,04	0,35±0,02	0,58±0,04
46D5NP	1,15±0,08	1,07±0,07	1,07±0,08	1,07±0,06	1,30±0,11	1,07±0,08	1,35±0,11
TG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5HMC	0,33±0,04	0,32±0,02	0,32±0,01	0,34±0,03	0,32±0,02	0,34±0,04	0,30±0,06
FapyAde	0,37±0,02	0,19±0,01	0,39±0,03	0,43±0,03	0,35±0,03	0,61±0,05	0,50±0,03
8HA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2HA	0,19±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	0,18±0,01	0,16±0,01	0,20±0,02	0,15±0,01
FapyGua	3,10±0,18	3,05±0,21	2,96±0,19	3,12±0,20	3,12±0,19	2,96±0,22	2,96±0,18
28DHA	0,61±0,05	0,51±0,02	0,58±0,03	0,61±0,04	0,53±0,05	0,42±0,03	0,40±0,03
8HG	0,99±0,08	1,11±0,10	1,05±0,09	1,06±0,10	0,96±0,09	1,18±0,11	0,85±0,06
<b>TOPLAM</b>	<b>19,22±1,12</b>	<b>18,36±1,26</b>	<b>15,13±0,98</b>	<b>16,51±1,05</b>	<b>16,56±1,02</b>	<b>18,94±1,62</b>	<b>15,90±1,10</b>

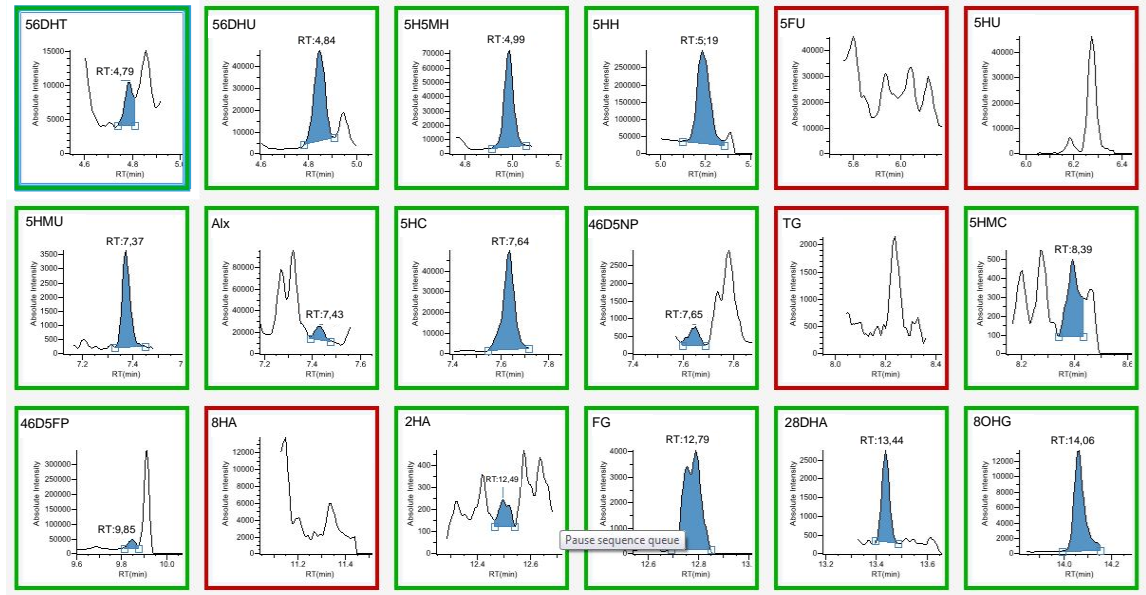
<LOD: tespit limitinin altında



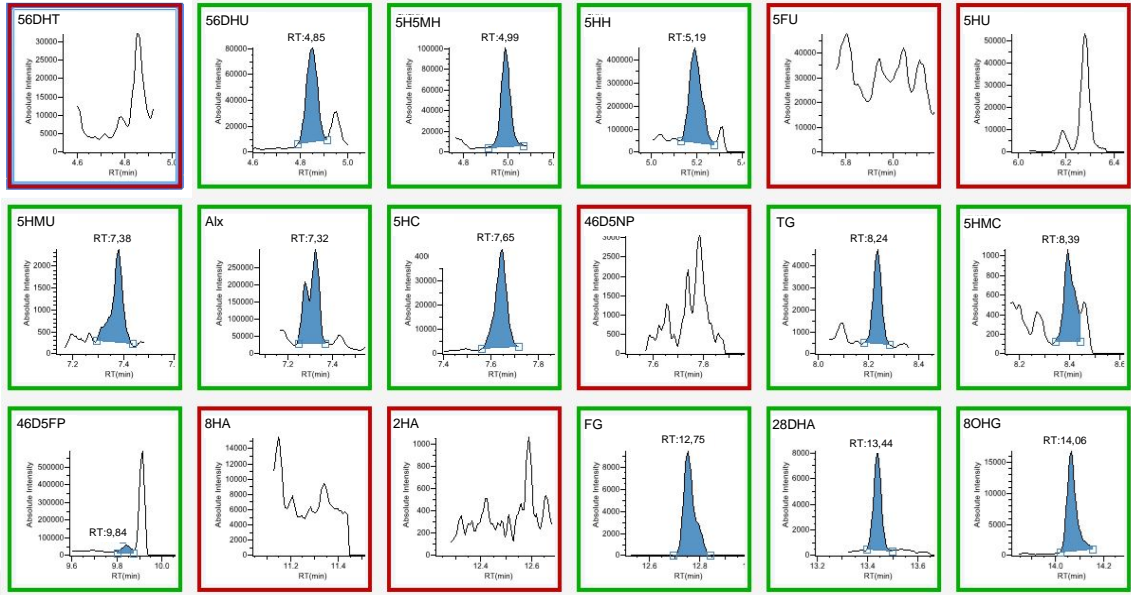
Standart antioksidanlar, bitkisel kaynaklı antioksidanlar ve 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenerek hazırlanan hücrelerin DNA'larının GC-MS/MS analizine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.5.3.3., 4.5.3.4., 4.5.3.5., 4.5.3.6., 4.5.3.7., 4.5.3.8. ve 4.5.3.9.'da görülmektedir.



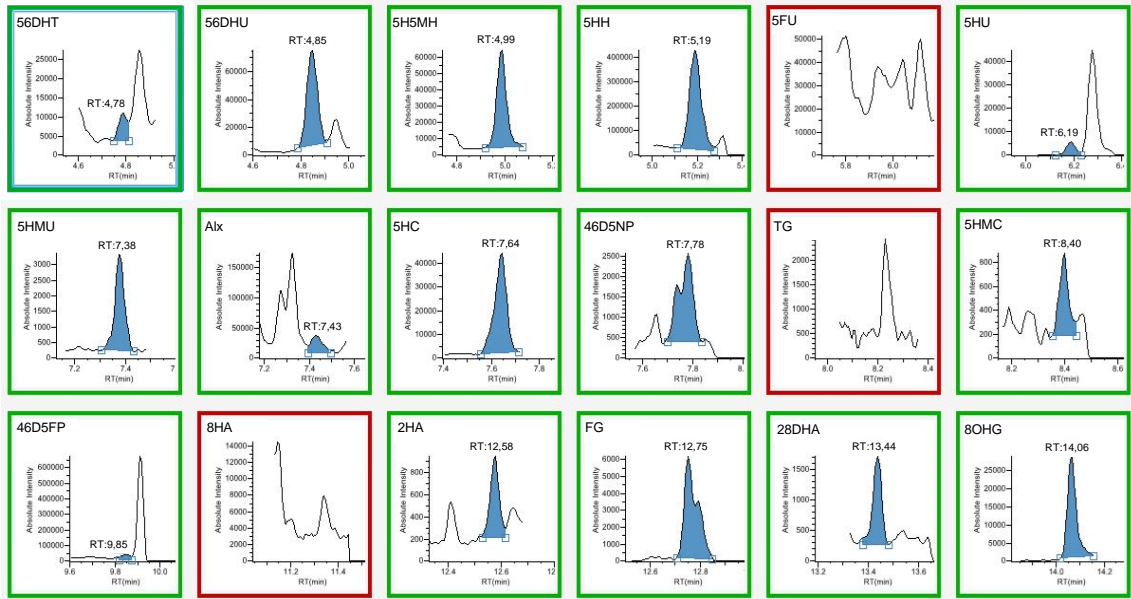
Şekil 4.5.3.3. 40  $\mu\text{M}$  karvakrol ve 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



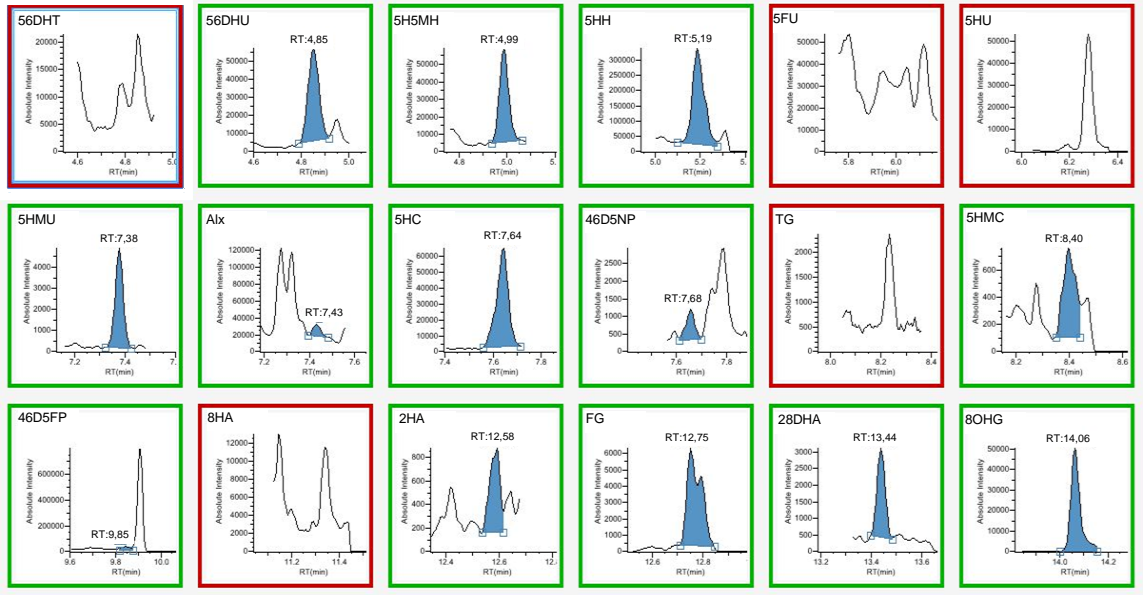
Şekil 4.5.3.4. 80  $\mu\text{M}$  timol ve 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



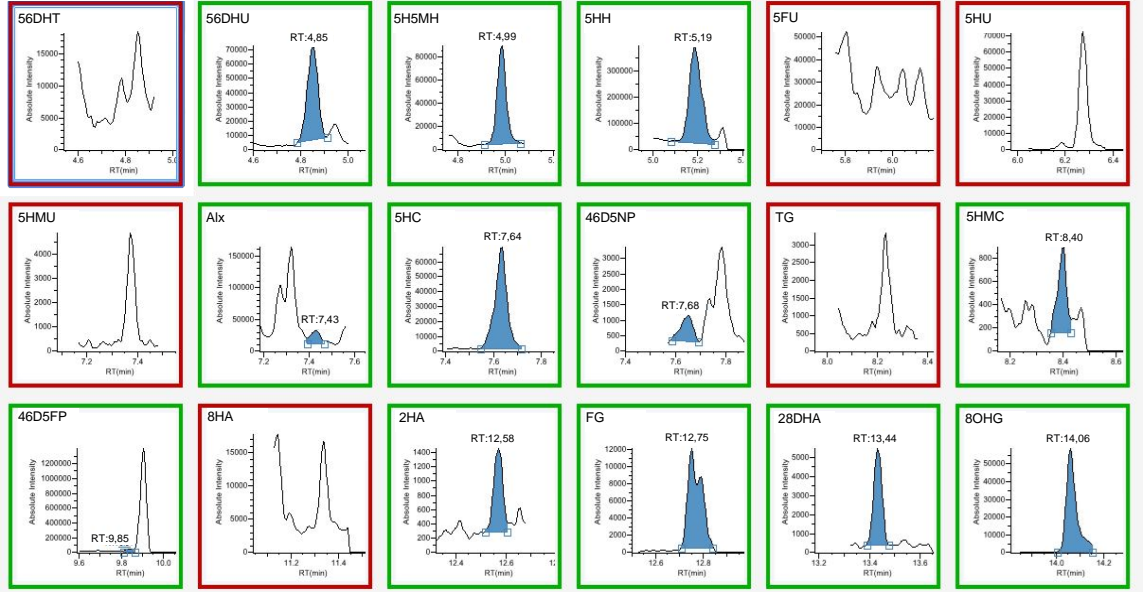
Şekil 4.5.3.5. 10  $\mu\text{M}$  timokinin ve 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



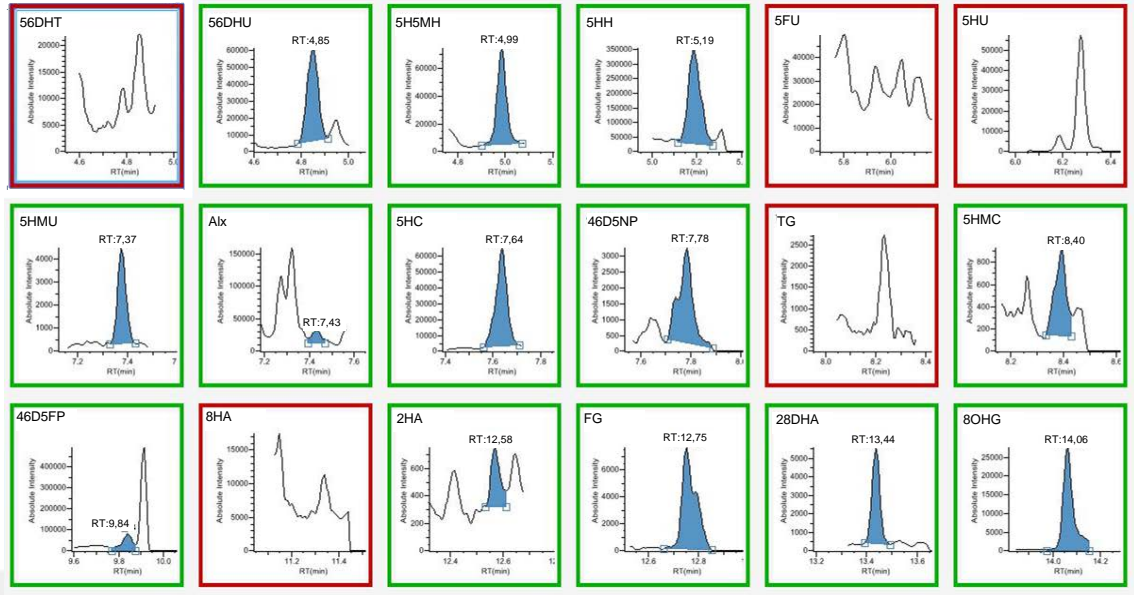
Şekil 4.5.3.6. Kekik suyu ve 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.5.3.7. Kekik yağı ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.5.3.8. Kekik su ekstraktı ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı



**Şekil 4.5.3.9.** Kekik su-metanol ekstraktı ve 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamdaki A549 hücrelerinden izole edilen DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı

#### 4.5.4. Hücre kültürü ortamında oksidan ve antioksidan varlığının sağlıklı akciğer hücrelerinde (BEAS-2B) DNA baz hasar ürünü miktarına etkisi

Sağlıklı akciğer hücresi (BEAS-2B) kültür ortamına alınıp çoğalmaya başladıktan kontrol numunesine herhangi bir şey eklenmeden 72 saat kültüre edilmiştir. Oksidasyon oluşturmak için hücreler çoğalmaya başladıktan 24 saat sonra kültür ortamına 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek kültür işlemine 48 saat daha devam edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmemiş ortamdaki hücrelerden izole edilen DNA'ya göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendiğinde DNA baz hasar ürünlerinde bir miktar artış gözlenmiştir. Kontrol numunesinde, taranan 18 DNA baz hasar ürününden 6 tanesi tespit edilmiş, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamdaki hücrelerin DNA'sında ise 11 baz hasar ürünü tespit edilmiştir. Malign akciğer hücreleri üzerinde DNA bazlarında oksidatif hasar oluşumunu en fazla önleyen timokinon ve kekiğin su-metanol ekstraktının sağlıklı akciğer hücrelerinde de DNA baz hasarını önleme miktarı incelenmiştir. Timokinon eklenen kültür ortamındaki hücrelerde 9 baz hasar ürünü ekstrakt eklenen kültür ortamındaki hücrelerde 10 baz hasar ürünü tespit edilmiştir. Her ikisinde de toplam DNA baz hasar ürünü miktarında azalma tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.5.4.1.** BEAS-2B hücre kültürü ortamında kontrol, 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve antioksidan varlığında 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendikten sonra hücrelerden elde edilen DNA'daki DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

	Kontrol	-	Timokinon	Su-met. eks.
		20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>56DHT</b>	<LOD	0,19±0,02	0,16±0,02	0,11±0,02
<b>56DHU</b>	0,33±0,03	6,11±0,52	3,87±0,41	2,16±0,23
<b>5H5MH</b>	0,97±0,08	1,54±0,09	0,64±0,05	0,93±0,08
<b>5HH</b>	<LOD	2,01±0,12	0,81±0,07	1,06±0,09
<b>5FU</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>5HU</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>5HMU</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Alx</b>	1,73±0,15	1,87±0,16	1,78±0,12	1,87±0,13
<b>5HC</b>	2,39±0,16	2,59±0,15	2,62±0,13	2,51±0,12
<b>46D5NP</b>	<LOD	1,07±0,08	1,28±0,1	1,25±0,10
<b>TG</b>	<LOD	0,01±0,00	<LOD	<LOD
<b>5HMC</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>FapyAde</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>8HA</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>2HA</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>FapyGua</b>	3,06±0,22	3,44±0,26	3,17±0,20	2,98±0,21
<b>28DHA</b>	0,53±0,03	0,68±0,06	0,57±0,04	0,70±0,05
<b>8HG</b>	<LOD	0,44±0,03	<LOD	0,11±0,01
<b>TOPLAM</b>	9,01±0,32	19,95±0,65	14,90±0,51	13,68±0,39

<LOD: tespit limitinin altında

Sağlıklı akciğer hücrelerinde malign akciğer hücrelerinden daha az miktarda DNA baz hasar ürünü belirlenmiştir. Ayrıca tespit edilen DNA baz hasar ürünü sayısı da sağlıklı hücreler de daha azdır. Malign akciğer hücresi kontrol numunesinde 10 DNA baz hasar ürünü tespit edilmişken, sağlıklı akciğer hücresi kontrol numunesinde 6 DNA baz hasar ürünü tespit edilmiştir. 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidasyonu oluşturulduktan sonra malign hücrelerde toplam DNA baz hasar ürünleri kontrole göre %112 artarken sağlıklı hücrelerde %121 artış göstermiştir. Antioksidan varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendiğinde ise DNA baz hasar ürünlerinin oluşumunu en fazla kekiğin su-metanol ekstraktının engellediği gözlenmiştir.

## 5. SONUÇ

Tüm canlılarda metabolizmada ve çevresel etkiler nedeniyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin, özellikle de hidroksil radikalının protein, lipid, DNA, RNA gibi önemli makromoleküllerle reaksiyona girip hücre yapı ve fonksiyonunu bozarak birçok patolojik olaya katkısı olduğu bilinmektedir. Bu patolojik olaylar kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve kanser gibi hastalıklar oluşmasına yol açmaktadır. DNA'nın oksidatif hasarının karsinogenezin başlangıç, ilerleme ve maligniteye dönüşüm evrelerinin her birinde rol sahibi olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Canlılar bu zararlı etkilerden korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan pek çok mekanizma ile kendilerini savunur. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres meydana gelir. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler antioksidan özellikleri nedeniyle reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı organizmanın korunmasında ve radikal hasarına bağlı bozuklukların önlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

Bu çalışmada öncelikle kullanılan kekik bitkisinin (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link.) Ietswaart) antioksidan özellikleri ortaya koyulmuştur. Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite tayini sonucunda yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğu, HPLC analizleri sonucunda da yapısındaki temel antioksidan maddelerin literatüre de uygun olarak karvakrol ve timol olduğu belirlenmiştir.

Kekik bitkisinin içerdiği karvakrol ve timol molekülleri ile bunların oksidasyon ürünlerinden biri olan ve çörek otunda da bulunan timokinon molekülünün hidroksil radikalini süpürme özellikleri araştırılmıştır. Sulu çözelti ortamında Fenton reaksiyonu sonucu oluşturulan hidroksil radikali ile karvakrol, timol ve timokinon arasındaki oksidasyon kinetiği sabitleri belirlenmiştir. Karvakrol, timol ve timokinon arasından hidroksil radikali ile en hızlı reaksiyon veren molekülün timokinon olduğu belirlenmiştir. ABTS yöntemi ile yapılan antioksidan kapasite tayininde de timokinonun en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Hidroksil radikali ile en yavaş reaksiyonu veren karvakrolün de en düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu



belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre molekülün hidroksil radikalini süpürme hız sabiti ile antioksidan kapasite değerinin ilişkili olduğu görülmüştür.

DNA'nın oksidanlara maruz kalması sonucu oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin GC-MS/MS ile yüksek duyarlılıkta tayini için öncelikle örnek hazırlama ve metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Örnek hazırlama ve cihaz parametreleri optimize edilerek literatürde ilk kez 18 adet DNA oksidatif baz hasar ürününün ng/L seviyesinde ve eş zamanlı tayini yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile buzağı timüs DNA'sı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Buzağı timüs DNA'sında Fenton reaksiyonu ile oluşturulan hidroksil radikalinin yol açacağı oksidatif hasara karvakrol, timol, timokinon moleküllerinin etkisi incelenmiştir. Buzağı timüs DNA'sı ve antioksidan içeren ortamda Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşturulmuş, DNA oksidatif baz hasar ürünleri GC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Antioksidanların varlığında DNA'da oksidatif baz hasarı oluşumunun büyük oranda engellendiği belirlenmiştir.

Karvakrol, timol, timokinon molekülleri ile kekik bitkisinin su ve su-metanol ekstraktı, yağ altı suyu ve yağı elde edilerek malign akciğer hücrelerinde (A549) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oluşturacağı DNA oksidatif baz hasarını engelleme etkinliği araştırılmıştır. Etkisi incelenen maddeler toksik olmayan dozlarda hücre kültürü ortamına eklendikten hemen sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de eklenmiştir. 48 saat sonunda hücreler alınıp DNA izolasyonu yapıldıktan sonra GC-MS/MS ile DNA oksidatif baz hasar ürünleri analiz edilmiştir. Antioksidanların hücre kültürü ortamında da DNA'da oksidatif baz hasarı oluşumu engellemeyi başardıkları belirlenmiştir. Çalışılan standart antioksidanlar arasında timokinonun, bitkisel kaynaklı numuneler arasında da su-metanol ekstraktının DNA'yı oksidatif hasar oluşumuna karşı en iyi koruduğu belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidasyona karşı hücre DNA'sını en iyi koruduğu tespit edilen timokinon ve kekiğin su-metanol ekstraktının hücre kültürü ortamında sağlıklı akciğer hücreleri (BEAS-2B) üzerine de etkisi incelenmiş, sağlıklı akciğer hücrelerinin DNA'sını da oksidasyona karşı korudukları belirlenmiştir. Diğer taraftan, DNA hasar ürünlerinin düşük konsantrasyonlarda tayin edilebilmesi akciğer kanseri erken teşhisinde bu moleküllerin biyomarker olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Tez kapsamında çalışılan antioksidan maddelerin ve bitkisel kaynaklı numunelerin DNA oksidatif hasarı ile ilgili hastalıklarda önleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak, çalışmamız hücre kültürü ortamında yapılan in vitro bir çalışmadır. İnsan sağlığına olası etki ve yan etkilerini aydınlatmak için in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.





## KAYNAKLAR

**Akçay, T. 2006.** Nükleik Asitler: İnsan Biyokimyası, Editörler: Onat, R., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Palme, Ankara, s. 395–488.

**Aköz, M., Vatansev, H., Gürbilek, M., Akkuş, İ., Vatansev, C., Kaptanoğlu, B. 2000.** Glutasyon S-Transferaz (GST) İzoenzimlerinin Çeşitli Kanser Vakalarında Araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 10(1):1–6.

**Albertsen, J. 2006.** The toxicity of iron, an essential element, *Veterinary Medicine*, 82–90.

**Anonim, 2015.** Tümör Supressor Genler <http://www.kansergenetiği.com/tr/kanser-ve-genetik-tumor-supressor-genler>, (Erişim tarihi: 25.12.2015)

**Anonim, 2016a.** Türkiye’de Kanser İstatistikleri <http://www.turkkanser.org.tr/dosyalar/istatistikler/turkiye-kanser-istatistikleri.pdf> (Erişim tarihi: 25.01.2016)

**Anonim 2016b,** Akciğer Kanseri, <http://www.toraks.org.tr/halk/Page.aspx?d=11> (Erişim tarihi: 25.01.2016)

**Aslan, D. 2006.** Hücre Büyümesi, Farklılaşması ve Kanser: İnsan Biyokimyası, Editörler: Onat, R., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Palme, Ankara, s. 691–741.

**Aviel-Ronen, S., Blackhall, F.H., Shepherd, F.A., Tsao, M.S. 2006.** K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer*, 8: 30–38.

**Badary, O.A. 1999.** Thymoquinone Attenuates Ifosfamide-Induced Fanconi Syndrome in Rats and Enhances its Antitumor Activity in Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 135–142.

**Bader N, Bosy-Westphal A, Koch A, Mueller M.J. 2006.** Influence of vitamin C and E supplementation on oxidative stress induced by hyperbaric oxygen in healthy men. *Ann Nutr Metab.* 503: 173–176.

**Baglioni S, Genuardi M. 2004.** Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 129: 35–43.

**Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. 2005.** DNA–protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research*, 589: 111–135.

**Başer, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G. 1994.** The Essential Oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* of Turkish Origin. *J. Essent. Oil Res.*, 6: 31–36.

**Beaglehole, R., Irwin, A., Prentice, T. 2004.** The World Health Report 2004. World Health Organization, Geneva.

**Belzile, J.P., Choudhury, S.A., Cournoyer, D., Chow, T.Y.K. 2006.** Targeting DNA Repair Proteins: A Promising Avenue for Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 6: 111–123.

**Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M. 1994.** Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanism. *New phytologist*, 127: 617–623.

**Birben, E., Şahiner, Ü.M., Saçkesen, C., Erzurum, S., Kalaycı, Ö. 2012.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 9–19.

**Boiteux, S., Robertson, S.J. 2013.** DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 93: 1025–1064.

**Boyle, P., Levin, B. 2008.** Dünya Kanser Raporu 2008, Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu. Lyon.

**Bozkurt, B., Selçuk, Z.T., Fırat, P., Kalyoncu, A.F., Artvinli, M. 2004.** 1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi. *Türk Toraks Dergisi*, 5(3): 148–153.

**Brooks, P.J. 2007.** The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous dna lesions that cause neurodegeneration in xeroderma pigmentosum. *Neuroscience*, 145: 1407–1417.

**Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. 2010.** Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15: 186–190.

**Bütünler, B.D., Kantarcı, G. 2006.** Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(2): 149–170.

**Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.L. 2003.** Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*, 531: 5–23.

**Catelinois, O., Rogel, A., Laurier, D., Billon, S., Hemon, D., Verger, P., Tirmarche, M. 2006.** Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environmental Health Perspectives*, 114(9): 1361–1366.

**Ceylan, A. 1996.** Tıbbi ve Aromatik Bitkiler, Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, Teknik bülten: 29.

**Chaisson, M.J. P., Huddleston, J., Dennis, M.Y., Sudmant, P.H., Malig, M., Hormozdiari, F., Antonacci, F., Surti, U., Sandstrom, R., Boitano, M., Landolin, J.M., Stamatoyannopoulos, J.A., Hunkapiller, M.W., Korlach, J., Eichler, E.E. 2015.** Resolving the complexity of the human genome using single-molecule sequencing. *Nature*, 517: 608–611.

- Chun, S.S., Vatter, A.V., Lin, Y.T., Shetty, K. 2004.** Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process in Biochemistry*, 40: 809–816.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J. 2003.** Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB Journal*, 17(10): 1195–1214.
- Coyle, Y.M., Minahjuddin, A.T., Hynan, L.S., Minna, J.D. 2006.** An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(7):654–661.
- Croteau, D.L., Bohr, V.A. 1997.** Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41): 25409–25412.
- Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., Evans, F.E. 1989.** Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chemical research in toxicology*, 2(6): 416–422.
- De Martinis, B.S., De Lourdes Pires Bianchi, M. 2002.** Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacology Research*, 46(2): 129–131.
- Dexheimer, T.S. 2013.** DNA Repair Pathways and Mechanisms: DNA Repair of Cancer Stem Cell, Ed.: Mathews, L.A., Cabarcas, S.M., Hurt, E., Springer, USA, pp: 19–32.
- Dianzani, I., Gibello, L., Biava, A., Giordano, M., Bertolotti, M., Betti, M., Ferrante, D., Guarrera, S., Betta, G.P., Mirabelli, D., Matullo, G., Magnani, C. 2006.** Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutation Research*, 599: 124–134.
- Digweed M. 2003.** Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. *Toxicology*, 193: 111–124.
- Dizdaroğlu, M. 1991.** Chemical Determination of Free Radical-induced Damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10: 225–242.
- Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H. 2002.** Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11): 1102–1115.
- Dizdaroğlu, M. 2012a.** Oxidatively Induced DNA Damage. Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, 22-25 Mayıs 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- Dizdaroğlu, M. 2012b.** Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327: 26–47.

**Dizdaroğlu, M. 2012c.** Measurement of DNA Damage. Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, 22-25 Mayıs 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

**Dizdaroğlu, M., Jaruga, P. 2012.** Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4): 382–419.

**Dubuisson, M., Vander, S.D, Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.F., Knoop, B. 2004.** Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Letters*, 571: 161–165.

**Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Cooke, M.S. 2004.** Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research*, 567: 1–61.

**Fan R., Kumaravel T.S., Jalali F., Marrano P., Squire J.A., Bristow R.G. 2004.** Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer Research*, 64(23): 8526–8233.

**Forlenza, M.J., Miller, G.E. 2006.** Increased serum levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosomatic Medicine*, 68: 1–7.

**Fraga, C.G. 2005.** Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 235–244.

**Friedberg, E.C. 2003.** DNA damage and repair. *Nature*, 421: 436–440.

**Fung, H., Kow, Y.W., Van Houten, B., Mossman, B.T. 1997.** Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis*, 18(4): 825–832.

**Giles, A.S., Seidel, A., Phillips, D.H. 1997.** Covalent DNA Adducts Formed by Benzo[c]chrysene in Mouse Epidermis and by Benzo[c]chrysene Fjord-Region Diol Epoxides Reacted with DNA and Polynucleotides. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 1275–1284.

**Gorlova, O.Y., Weng, S.F., Zhang, Y., Amos, C.I., Spitz, M.R., 2007.** Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 121: 111–118.

**Göksel, T., Yıldız, P., Altın, S., Başer, S., Bayız, H., Görgüner, M., Yurdakul, A.S. 2010.** Akciğer Kanseri: Türkiye’de Temel Akciğer Sağlığı Sorunları ve Çözüm Önerileri, Editör: Metintaş, M., Sentez, Ankara, s. 55–70.

**Gromer, S, Urig, S, Becker, K. 2004.** The thioredoxin system from science to clinic. *Med Res Rev*, 24: 40–89.

**Gülçin, İ. 2012.** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.*, 86: 345–391.

- Gürbüz, B., İpek, A., Ayvaz, N. 2011.** Türkiye Florasındaki *Origanum* Türlerinin Yayılış Alanları ve Ticareti. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (2): 55–58.
- Hackshaw, A.K., Law, M.R., Wald, N.J. 1997.** The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*, 315: 980–988.
- Halliwell, B. 2002.** Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker?. *Free Radical Biology & Medicine*, 32: 968–974.
- Halliwell, B., 2006.** Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141(2): 312–322.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I. 1991.** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9–19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2005.** Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford Science Publications Pres Inc., London, 527 pp.
- Hari, Y., Obika, S., Imanishi, T. 2012.** Towards the Sequence-Selective Recognition of Double-Stranded DNA Containing Pyrimidine-Purine Interruptions by Triplex-Forming Oligonucleotides. *Eur. J. Org. Chem.*, 2875–2887.
- Herbst, R.S., Heymach, J.V., Lippman, S.M. 2008.** Lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(13): 1367–1380.
- Jaruga, P. , Kırkalı, G., Dizdaroğlu, M. 2008.** Measurement of formamidopyrimidines in DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, 45: 1601–1609.
- Jaruga, P., Dizdaroğlu, M. 2010.** Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-20-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397: 48–52.
- Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L. 2007.** Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association?. *Irish Medical Journal*, 100(2): 367–369.
- Kasai, H., 1997.** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2X-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*, 387: 147–163.
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R. 2015.** Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(5): 226–234.
- Karik, Ü., Tınmaz, A.B., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C., Tümen, G. 2007.** İstanbul kekiği (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) populasyonlarında farklı biçim zamanlarının verim ve kaliteye etkileri. *Bahçe*, 36 (1-2): 37–48.

- Kaur, C., Kapoor, H.C. 2001.** Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703–725.
- Keskin, S. 2010.** Akciğer Kanserinin Biyolojisi ve Terapötik İlişkiler: Akciğer Kanserinde Tedavi ve Bakım, Editörler: Aydınlar, A, Can, G., İpomet, İstanbul, s. 7–12.
- Kılıç, A. 2008.** Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13): 37–45.
- Kılıç, Ö., Bağcı, Ö. 2008.** *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C.Koch) Ietswaart'nin Uçucu Yağ Verimi, Kompozisyonu ve Çay Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması Üzerine Bir Çalışma. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(1): 83–89.
- Kırimer, N., Köseoğlu, Ç., İşcan, G., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. 2012.** Bazı yağ altı sularının uçucu bileşikleri ve mikrobiyal kontrolleri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16: 23–28.
- Kijima, T., Maulik, G., Salgia, R. 2003.** Molecular Alterations in Lung Cancer: Lung Cancer, Diagnostic and Therapeutic Methods and Reviews, Ed.: Driscoll, B., Humana Press Inc., New Jersey, pp: 29–38.
- Kruk, I., Michalska, T., Kladna, A., Aboul-Enein, H.Y. 2010.** Prooxidant action of carazolol in the Fenton-like reaction. *Luminescence*, 26: 429–433.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B. 2011.** Polycarpus Pissis, Alexandros G. Georgakilas, Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711: 193–201.
- Kudlackova, M.K., Dusinska, M., Valachovicova, M., Blazicek, P., Paukova, V. 2006.** Products of DNA protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. *Physiol Res*. 552: 227–231.
- Kumari, S., Rastogi, R.P., Singh, K.L., Singh, S.P., Sinha, R.P. 2008.** DNA Damage: Detection Strategies. *EXCLI Journal*, 7: 44–62.
- Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N. 2004.** Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43: 52–61.
- Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A. 2000.** Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 48(5): 1442–1448.
- Le Page, F., Guy, A., Cadet, J., Sarasin, A., Gentil, A. 1998.** Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 26(5): 1276–1281.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. 2003.** Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 21–33.

**Liang, Y., Wnuk, S.F. 2015.** Modification of Purine and Pyrimidine Nucleosides by Direct C-H Bond Activation. *Molecules*, 20: 4874–4901.

**Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118–126.

**Martins, R.R.L., Neves, M., Silvestre, A.J.D., Silvia, A.M.S.J., Caveleiro, J.A.S. 1999.** Oxidation of Aromatic Monoterpenes with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Mn Porphyrin Complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 137: 41–47.

**Masthan, K.M.K., Aravindhya, B.N., Balachander, N., Rani, V., Gayathiri, K., Anitha, N. 2014.** An Insight on Important Oncogenes –A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2): 1364–1369.

**McDorman, K.S., Pachkowski, B.F., Nakamura, J., Wolf, D.C., Swenberg, J.A. 2005.** Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in long-evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-Biological Interactions*, 152(2-3): 107–117.

**Meydani, M. 2001.** Antioxidants and Cognitive Function. *Nutrition Reviews*, 59(8): 75–82.

**Mu, D., Tursun, M., Duckett, D.R., Drummond, J.T., Modrich, P., Sancar, A. 1997.** Recognition and Repair of Compound DNA Lesions (Base Damage and Mismatch) by Human Mismatch Repair and Excision Repair Systems. *Molecular and Cellular Biology*, 17(2): 760–769.

**Neri, M., Taioli, E., Filiberti, R., Ivaldi, G.P., Canessa, P.A., Verna, A., Marroni, P., Puntoni, R., Hirvonen, A., Garte, S. 2006.** Metabolic genotypes as modulators of asbestos-related pleural malignant mesothelioma risk: A comparison of Finnish and Italian populations. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 209: 393–398.

**Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S. 2006.** Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chem Rev.* 106(2): 277–301.

**Novak, J., Christina, B., Langbehn, B., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y., Franz, C.M. 2000.** Ratios of cis- and trans-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Benth) Vogel. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 697–704.

**O'Reilly, K.M., Mclaughlin, A.M., Beckett, W.S., Sime, P.J. 2007.** Asbestos-related lung disease. *American Family Physician*, 75(5): 683–688.

**Özel, G.S.K., Birdane, Y.O. 2014.** Antioksidanlar. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7(2): 41–52.

**Parimoo, S., Parimoo, B. 2003.** Sample Preparation in DNA Analysis: Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Ed.: Mitra, S., John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA, pp: 271–300.

**Pierotti, M.A., Sozzi, G., Croce, C.M. 2004.** Oncogenes: Cancer Medicine, Ed.: Holland F., BC Decker Inc., USA, pp: 73–85.

**Price, S., Price, L. 2011.** Aromatherapy for Health Professionals, Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 400 pp.

**Reddy, P., Jaruga, P., O'Connor, T., Rodriguez, H., Dizdaroğlu, M. 2004.** Overexpression and rapid purification of *Escherichia coli* formamidopyrimidine–DNA glycosylase. *Protein Expression and Purification*, 34: 126–133.

**Reis, A., Spickett, C.M. 2012.** Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 2374–2387.

**Richmond, T.J., Davey, C.A. 2003.** The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936): 145–150.

**Robin, Arora, S., Pal Vig, A. 2015.** Inhibition of DNA oxidative damage and antimutagenic activity by dichloromethane extract of Brassica rapa var. rapa L. Seeds. *Industrial Crops and Products*, 74: 585–591.

**Saito, S., Yamauchi, H., Hasui, Y., Kurashige, J., Ochi, H., Yoshida, K. 2000.** Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dg) by using ELISA. *Research Communicaton Molecular Pathology and Pharmacology*, 107(1-2): 39–44.

**Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Gaddameedhi, S., Selby, C.P., Ye, R., Chiou, Y.Y., Kemp, M.G., Hu, J., Lee, J.H., Ozturk, N. 2015.** Circadian Clock, Cancer, and Chemotherapy. *Biochemistry*, 54: 110–123.

**Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J. 2000.** Mitochondrial Oxidative Stress Plays a Key Role in Aging and Apoptosis. *IUBMB Life*, 49: 427–435.

**Shoukamy, M.I., Nakano, T., Ohshima, M., Hirayama, R., Uzawa, A., Furusawa, Y., Ide, H. 2012.** Detection of DNA–protein crosslinks (DPCs) by novel direct fluorescence labeling methods: distinct stabilities of aldehyde and radiation-induced DPCs. *Nucleic Acids Research*, 1–13.

**Sieber O, Heinimann, K, Tomlinson, I. 2005.** Genomic stability and tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 15: 61–66.

**Simic, M.G. 1994.** DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Research*, 54: 1918–1923.

**Sonntag, C.V. 2006.** Free radical induced DNA damage and its repair a chemical perspective. Springer, Germany, 523 pp.

**Sözmen, E.Y. 2006.** Yaşlanma Biyokimyası: İnsan Biyokimyası, Editörler: Onat, R., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Palme, Ankara, s. 743–758.



- Tuteja, N., Singh, M.B., Misra, M.K., Bhalla, P.L., Tuteja, R. 2001.** Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4): 337–397.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006.** Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2008.** Molecular Biology of the Gene, CSHL Press, USA, 880 pp.
- Williams, G.M. 2001.** Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166: 3–10.
- Williams, G.M., Jeffrey, A.M. 2000.** Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3): 283–292.
- Yokuş, B., Çakır, D.Ü. 2012.** In vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*, 22: 535–543.
- Zaliznyak, T., Lukin, M., de los Santos, C. 2012.** Structure and Stability of Duplex DNA Containing (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine: An Oxidatively-generated Lesion Repaired by NER. *Chem. Res. Toxicol.*, 25(10): 2103–2111.
- Zeytinoğlu, H., Incesu, Z., Başer, K.H.C. 2003.** Inhibition of DNA synthesis by Carvacrol in Mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10: 292–299.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Önder AYBASTIER  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Bursa 01.02.1983  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**  
**Lise** : Bursa Atatürk Lisesi, 2000  
**Lisans** : Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Bölümü, 2005  
**Yüksek Lisans** : Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü,  
Kimya Anabilim Dalı, 2010  
**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl** : Uludağ Üniversitesi, 2009  
**İletişim (e-posta)** : aybastier@uludag.edu.tr

### Yayımları

**Aybastier Ö., Demir C. 2010.** Optimization of Immobilization Conditions of *Thermomyces lanuginosus* Lipase on Styrene-divinylbenzene Copolymer Using Response Surface Methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63: 170-178.

**Aybastier Ö., Şahin S., Sarıburun E., Demir C. 2011.** Determination of Total Phenolic Content in Prunella L. by Horseradish Peroxidase Immobilized onto Chitosan Bioreactor. *Analytical Methods*, 3: 2289-2297.

**Şahin S., Işık E., Aybastier Ö., Demir C. 2012.** Orthogonal Signal Correction-based Prediction of Total Antioxidant Activity Using Partial Least Squares Regression from Chromatograms. *Journal of Chemometrics*, 26: 390-399.

**Aybastier Ö., Şahin S., Demir C. 2013.** Response Surface Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Quercetin and Isolation of Phenolic Compounds From Hypericum Perforatum L. by Column Chromatography. *Separation Science and Technology*, 48: 1665-1674.

**Aybastier Ö., Işık E., Şahin S., Demir C. 2013.** Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44: 558-565.

**Şahin S., Aybastier Ö., Işık, E. 2013.** Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Artemisia Absinthium Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 141: 1361-1368.

**Aybastier Ö., Demir C. 2014.** Immobilization of *Candida antarctica* Lipase A on Chitosan Beads for Production of Fatty Acid Methyl Ester from Waste Frying Oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 36: 2313-2319.