

**SİLİBİNİN VE HELİXOR'UN DNA
KORUYUCU VE TAMİR
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**
Fusun KILÇIK

DANIŞMAN
Doç.Dr.İbrahim Hakkı CİĞERCİ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI
Temmuz, 2013

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SİLİBİNİN VE HELİXOR'UN DNA KORUYUCU VE TAMİR
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Fusun KILÇIK

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Fusun KILÇIK tarafından hazırlanan “Silibinin ve Helixor’un DNA Koruyucu ve Tamir Potansiyellerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 04/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Başkan : Doç. Dr. S. Elif KORCAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye :Yard. Doç. Dr. Recep LİMAN
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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.

04/07/2013

Fusun Kılçık

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİLİBİNİN VE HELİXOR'UN DNA KORUYUCU VE TAMİR POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Fusun KILÇIK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Bu çalışmada, oksidatif stresten kaynaklanan DNA hasarına karşı *Silybum marianum*'un etken maddelerinden Silibinin'in (S) ve *Viscum album*'un ticari şekli olan Helixor'un (H) koruyucu ve tamir edici etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla haploid *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his 3Δ1 leu2 Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) kullanıldı. Kullanılan etken maddelerin koruyucu ve hasar tamir indüksiyon etkileri alkali tek hücre jel elektroforezi (comet assay) yöntemi kullanılarak belirlendi. Silibinin ve Helixor, *S. cerevisiae* hücrelerine 1µg/mL ve 10 µg/mL'lık konsantrasyonlarda uygulandı. Sonuçlarımız hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oluşturulan DNA hasarına karşı Silibinin ve Helixor'un maya hücrelerini koruduğunu göstermiştir. Uygulama sonucunda, her iki etken maddenin de 10 µg/mL'lık konsantrasyonda, hücrede koruyucu etki gösterdiği belirlendi. Silibinin 10 µg/mL'lık konsantrasyonunun DNA tamir indüksiyonunu artırdığı bulundu.

2013, ix + 61 sayfa

Anahtar kelimeler: Oksidatif DNA hasarı, comet assay, *Saccharomyces cerevisiae*, Silibinin, Helixor

ABSTRACT

M.Sc Thesis

DETERMINATION OF DNA PROTECTION AND REPAIR POTENTIALS OF SILIBININ AND HELIXOR

Fusun KILÇIK

University of Afyon Kocatepe

Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

In this study, It was aimed that determination of protective and reparative effects of Helixor which is commercial version of Silibinin's and *Viscum albium*'s active substances of *Silybum marianum*, against DNA damage occurring cause of oxidative stress. For this purpose, haploid *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his 3Δ1 leu2 Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) was used. Protective and reparative induction effects of used active substances determined by using alkaline single cell gel electrophoresis method. 1µg/mL and 10 µg/mL concentrations were applied to Silibinin ve Helixor, *S. cerevisiae* cells. Our results shows that, against to the DNA damage generated by H₂O₂ Silibinin and Helixor protect the ferment cells. As a result of the application, in both of active sunstances' 10 µg/mL concentrations determined that shows protective effect on cell. It was found that 10 µg/mL concentration of Silibinin increases the DNA repaire induction.

Key Words: Oksidatif DNA damage, comet assay, *Saccharomyces cerevisiae*, Silibinin, Helixor

2013, ix + 61 pages

TEŞEKKÜR

Tezim boyunca bana her türlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni cesaretlendirip bu çalışmaya teşvik eden çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren ve hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim çok sevgili aileme gönülden teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında hep yanımda olan yüksek lisans öğrencilerinden çok sevgili arkadaşlarım Bilgi AKSOY, Fatma Tuğçe ÜNAL ve doktora öğrencisi Şöhret YÜKSEK'e teşekkür ederim.

Fusun KILÇIK

AFYONKARAHİSAR, 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 DNA Hasarı.....	3
2.2. DNA Tamir Mekanizmaları.....	5
2.2.1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi.....	6
2.2.2. Kesip çıkarma onarımı (Eksizyon).....	7
2.2.3. Rekombinasyonel Tamir.....	10
2.2.4. SOS Tamiri.....	10
2.2.5. DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamiri.....	10
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	12
2.4. Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Fitokimyasallar.....	17
2.5. <i>Silybum marianum</i> L. (Devedikeni) Bitkisi.....	18
2.6. <i>Viscum album</i> L. (Ökse otu) Bitkisi.....	22
2.7. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler.....	25
3. MATERYAL ve METOT.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	27
3.1.2. Kullanılan Test Mikroorganizmalar.....	28
3.1.3. Test İçin Kullanılan Bitki Materyali.....	28
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler.....	28
3.1.4.1. Normal kaynama dereceli agar (NMA) (%1).....	28
3.1.4.2. Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (%1).....	28
3.1.4.3. Sorbitol Tamponu.....	29

3.1.4.4. Litikaz Tamponu.....	29
3.1.4.5. Lizis Tamponu.....	29
3.1.4.6. Elektroforez Tamponu.....	30
3.1.4.7. H ₂ O ₂ Çözeltisi.....	30
3.1.4.8. Etidyum Bromür Çözeltisi.....	30
3.1.4.9. Silibinin.....	30
3.1.4.10. Helixor.....	30
3.1.5. Kullanılan Besi Yerleri.....	31
3.1.5.1. Katı ve Sıvı Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besi Yeri.....	32
3.2. Metot.....	32
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Maya Suşunun Saklanması ve Üretilmesi.....	32
3.2.2. Maya Hücrelerinde Comet Yöntemi ile Silibinin ve Helixor'un DNA Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi.....	32
3.2.3. Maya Hücrelerinde Comet Yöntemi ile Silibinin ve Helixor'un DNA Hasarı Üzerine Tamir Edici Etkisi.....	33
3.2.4. Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerin Ölçülmesi.....	34
3.2.4.1. Total Oksidan Seviyesi (TOS).....	34
3.2.4.2. Total Antioksidan Seviye (TAS).....	35
3.2.4.3. İstatistikler Analizler.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Total Oksidan ve Antioksidan Seviye (TOS ve TAS).....	37
4.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Silibinin'in H ₂ O ₂ ile Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu Özelliğine ve Tamir İlişkin Bulgular.....	37
4.3. Farklı Konsantrasyonlardaki Silibinin'in H ₂ O ₂ ile Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu Özelliğine ve Tamir İndüksiyonuna İlişkin Bulgular.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
6. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk:	Dakika
dL:	Desilitre
gr:	Gram
<:	Küçüktür
µL:	Mikrolitre
mL:	Mililitre
mg:	Miligram
mM:	Milimolar
mA:	Miliamper
M:	Molar
nm:	Nanometre
°C:	Santigrat derece
V:	Volt
%:	Yüzde

Kısaltmalar

AP:	Apirimidinik / Apürinik bölge
Rpm:	Dakikadaki dönüş hızı
DNA:	Deoksiribonükleik asit
KH ₂ PO ₄ :	Dihidrojen potasyum fosfat
DMSO:	Dimetil sülfoksit
K ₂ HPO ₄ :	Dipotasyum fosfat
LMPA:	Düşük erime noktalı agar
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
AU:	Görsel skorlama tekniği
G-C:	Guanin-Sitozin
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HCl:	Hidroklorik asit
OH:	Hidroksil
HR:	Homolog rekombinasyon
KKD:	Kardeş kromatid değişimi
MDA:	Malondialdehit
CH ₃ :	Metil
NMPA:	Normal erime noktalı agar
N7-meG:	N7-metilguanin
mG:	O6-Metilguanin
OD:	Optik yoğunluk
KCl:	Potasyum Klorür
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RNA:	Ribonükleik asit
NaCl:	Sodyum klorür
NaOH:	Sodyum hidroksit
SH:	Standart hata

ssDNA:	Tek iplikli DNA
SSBs:	Tek iplik kırıklıkları
TUNEL:	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılığıyla dUTP son uç etiketlemesi
T-A:	Timin-Adenin
UV:	Ultraviyole
YPD:	Yeast Pepton Dextrose
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 Etidyum bromid ile boyanmış maya DNA'larının floresan mikroskop görüntüleri.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.3.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri.....	13
Çizelge 4.1 Silibinin'in ve Helixor' un total antioksidan, oksidan seviyeleri ve oksidatif stres indeksi değerleri.....	37
Çizelge 4.2.1 Silibinin'in H ₂ O ₂ ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı koruyucu ve tamir edici durumu.....	38
Çizelge 4.3.1 Helixor' un H ₂ O ₂ ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı koruyucu ve tamir edici durumu.....	40

1. GİRİŞ

Hücreler, yaşamsal faaliyetlerini sürdürdükleri dönem boyunca sıklıkla strese maruz kalırlar. Bu stresin temel hedeflerinden birisi de genomik DNA'dır. Genomik DNA'nın bütünlüğü; X-ışınları, ultraviyole ışınları, kimyasal bileşikler gibi çeşitli ekzojen ajanlar tarafından sürekli tehdit edilmektedir. Metabolik yan ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller gibi çeşitli endojen ajanlar da DNA'da hasarlara neden olmaktadır. Bu ekzojen ve endojen faktörlerin etkisiyle DNA üzerin de meydana gelen tüm bu değişikliklere "DNA hasarı" adı verilir (de Boer and Hoeijmakers 2000).

Organizmada serbest radikallerin meydana gelme hızı ve bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu duruma "oksidatif denge" adı verilir. Serbest radikallerin oluşum hızındaki bir artış ya da ortadan kaldırılma hızındaki bir düşüş oksidatif dengenin bozulmasına sebep olur. Bu dengenin bozulması olayı oksidatif stres olarak adlandırılır (Zhou *et al.* 2004).

Oksidatif stres, pek çok hastalık, yaşlanma ve hücre ölümü ile ilişkilidir. Serbest radikallerin ortamdaki fazlalığı, hücrelerin DNA'sına zarar veren çeşitli kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşumunda etkili olabilmektedir (Halliwell 2002).

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek amacıyla, organizmalarda kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi durumundadırlar. Bağlanan iki serbest radikali birleştirip, nötralize edebilme yeteneğine sahip bir enzime taşıyana kadar radikalle stabil bir yapı oluştururlar (Halliwell and Gutteridge 2005).

Silybum marianum (deve diken), Avrupa'da ve Akdeniz ülkelerinde antik zamanlardan beri kullanılmaktadır. I. yüzyılda kullanımı kayıtlıdır ve "Silybum" adı da I.yy'da ortaya çıkmıştır. O zamandan günümüze kadar yılan ısırığında, karaciğer hastalıklarında, sıtma ateşine karşı, varislerde, menstruasyon şikâyetlerinde, karaciğer tıkanıklıklarında, dalak ve böbrek problemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu

bitki hakkındaki kapsamlı araştırmalar ise son 30 yıl içerisinde ortaya konulmuştur (Foster 1990).

Viscum album L. Avrupa'da 1926'dan beri kanser hastalıklarının tedavisinde yardımcı olarak kullanılmaktadır. Bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak antitümör mekanizmasının özellikleri net biçimde ortaya konulamamıştır (Bussing *et al.* 1994). kse otu ekstraktlarının, doğal öldürücü hücreler ve nötrofillerin sayısını ve aktivitesini artırarak fagositozu aktif hale getirdiği ve immün sistemi uyardığı saptanmış, tedaviyle tekrar yapılanmış olan immün sistemin hasta için ciddi yarar sağladığı bildirilmiştir (Bussing *et al.* 1994).

DNA hasarı belirleme yöntemlerinden biri olan comet yöntemi, maya hücrelerinde de başarıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemin *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde kullanılması çoğu avantajı beraberinde getirir. *S. cerevisiae'* nin gerek hızlı üreyip gelişmesi, gerekse kolay kültüre edilebilmesi, bu organizmanın tercih edilme sebeplerindedir. Yüksek ökaryotlar ile mayalar arasında transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve DNA onarım mekanizmaları bakımından benzerlikler mevcuttur (Silva *et al.* 2005).

Bu çalışmada fitoterapide yaygın olarak kullanılan *Silybum marianum* ve *Viscum album* L. bitkilerinin, ticari etken maddelerine ait farklı konsantrasyonların, hidrojen peroksit ile indüklenmiş *Saccharomyces cerevisiae'* de, oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu ve tamir edici özelliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Hasarı

Bir organizmanın DNA'sının kararlılığı ve sağlamlığı, o organizmanın varlığını sürdürebilmesi için temel şarttır. Fakat DNA için en uygun ortam koşulları sağlansa bile, DNA ekzojen ve endojen genotoksik ajanlar tarafından sürekli olarak hasara uğratılır.(Boiteux and Guillet 2004). Genotoksik ajanlar, genetik materyalde hasara neden olmaktadır. Bu ajanlar metilleyici ve alkilleyici gibi basit yapılu bileşiklerden, kompleks yapılu hasar ajanlarına kadar pek çok yapısal çeşitlilik gösterirler (Guo *et al.* 1997). DNA' da meydana gelen hasarların sonuçları normalde olumsuzdur ve DNA baz modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları ve apuridik/apirimidinik (AP) lezyonların oluşumu gibi çeşitli tipteki DNA lezyonlarıyla sonuçlanır. Ayrıca DNA hasarlarının pek çoğu mutasyonlar, erken yaşlanma ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (Nash *et al.* 1996, Salmon *et al.* 2004, Milgrom *et al.* 2007).

Çeşitli tipteki DNA hasarları arasında, AP bölgeleri en sık görülen hasar tipleridir. (Boiteux and Guillet 2004). Yapılan bir çalışma göstermektedir ki normal insan karaciğer hücreleri genom başına yaklaşık 50.000 AP bölgesi ile kararlı bir denge halinde bulunabilmektedir. (Nakamura and Swenberg 1999). AP bölgelerinin bol olmasına ek olarak, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke ederek genetik bilgiye karşı esas tehlikeyi oluştururlar (Friedberg 2003). AP bölgeleri N-glikozidik bağın kendiliğinden hidrolizi ile ya da DNA'da hasarlı bölgelerin N-glikozilaz enzimi tarafından kaldırılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Dahası, tek iplik kırıklıkları (SSBs) ve 3'-5' sonlanmalarının meydana gelmesiyle DNA üzerinde N-glikozilaz /liyaz ya da AP endonükleaz enzimleri tarafından AP bölgelerinin uzaklaştırılması sonucunda bu bölgelerin DNA polimeraz veya DNA ligazlar tarafından substrat olarak kullanılamaz hale gelmesine sebep olmaktadır (Krokan *et al.* 1997).

İnseriyon/delesyonlar; deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler; yanlış eşleşmeler, depürinasyon/depüriminyasyon (10.000/hücre/gün) gibi kimyasal değişiklikler; baz kayıpları ve oksidatif hasar (100.000/hücre/gün) olarak

belirtilmektedir. Onarım yapılmadığı takdirde somatik mutasyonlar görülür (Altuntaş 2007).

Mutajenlerin pek çoğu iki baz çifti arasındaki boşluğa yerleşir. Bu olaya interkalasyon denir. İnterkalatörlerin çoğu düzlemsel ve aromatik moleküllerdir. Etidyum bromür, daunomisin ve doksorubisin bunlara örnek olarak verilebilir. (Ferguson and Denny 1991). İki baz çifti arasına bir interkalatörün girebilmesi için bunların arasının açılması, bu açılmanın olabilmesi için ise DNA sarmalının normalin aksi yönde gevşemesi gerekir. Bu olaylar meydana geldiğinde DNA eşleşmesi ve transkripsiyon engellenir, mutasyonlar ve zehirlenmeler meydana gelir. Bu yüzden DNA interkalatörlerinin pek çoğu kanserojendir. Benzopiren diol epoksit, akridin türevleri aflatoksin ve etidyum bromür bu maddenin iyi bilinen örneklerindedir (Jeffrey 1985). Bütün bu özelliklerine karşın, bu toksinler DNA transkripsiyonuna engel oldukları için hızla büyüyen kanser hücrelerini engellemek amacıyla kemoterapi de kullanılırlar (Braña 2001).

Hücreler UV ışınına maruz kaldığında DNA hasarı iki şekilde ortaya çıkabilmektedir. UV ışını H_2O_2 'e etki ederek $\cdot OH$ radikalini meydana getirebilir ya da doğrudan doğruya pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna sebep olabilir. Serbest radikaller DNA'ya etki eder. Ayrıca iyonize radyasyonun suyun hemolizine neden olarak, $\cdot OH$ radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir. İyonize radyasyonun suyun hemolizine neden olarak, $\cdot OH$ radikallerini meydana getirdiği ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir (Dizdaroğlu 1991).

DNA üzerinde meydana gelen olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgi üzerinde de değişiklik gösterebilir. Canlının içinde bulunduğu ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait olan DNA moleküllerinde hasara, meydana gelen hasarlar tamir edilemediği takdirde ise kontrollü hücre ölümlerine veya kansere kadar gidebilen çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Couladis *et al.* 2003).

DNA üzerinde oluşan hasarlar her zaman kanserle sonuçlanmaz. Düşük düzeylerde meydana gelen hasarlar etkili bir şekilde tamir mekanizmaları ile onarılırken, yüksek

düzyeyde oluşan oksidatif hasarlar ise hücre ölümine neden olurlar. Orta düzeyde meydana gelen hasarların ise maligniteye yol açma ihtimali oldukça yüksektir (Floyd 1990).

2.2. DNA Tamir Mekanizmaları

Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları ekzojen veya endojen olabilir. Canlı organizmalar, genetik materyallerini bu etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizmalarına sahiptirler. Hücre, DNA hasarlarına karşı farklı metabolik yollar ile cevap verir. DNA hasarı ve onarım mekanizmalarındaki bozukluklar ile kanser, yaşlanma ve birçok genetik hastalık arasında nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile gösterilmiştir. DNA onarım mekanizması, genomik kararlılığın korunması ve hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan moleküler biyolojik mekanizmalardan birisidir (Onur *et al.* 2009).

DNA tamir sisteminde 100' den fazla gen rol oynamaktadır. Bu genlerin kodladığı proteinler DNA tamir mekanizmalarında görev alırlar (Zhang *et al.* 2009). DNA tamir genleri iki alt grupta incelenir: (Tu *et al.* 1996, William and Michael 2002, Griffiths *et al.* 2005).

- 1) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesiyle ilgili olan genler,
- 2) Baz ve nükleotid çıkarma onarımı ve hatalı eşleşme onarımı ile ilgili genler

Bu genlerin yer aldığı tamir mekanizmaları başlıca beş ana grupta incelenebilir:

1) Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi

- a) Fotoreaktivasyon
- b) O-6-metilguanin tamiri
- c) Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

2) Kesip çıkarma tamiri (Eksizyon)

- a) Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)
- b) Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)
- c) Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

3) Rekombinasyon Tamiri

4) SOS Tamiri

5) DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

- a) Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması (NHEJ)
- b) Homolog Rekombinasyon (HR)

2.2.1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi

a) Fotoreaktivasyon

Termodinamik ve kinetik nedenlerden dolayı DNA'da meydana gelen hasarın geri döndürülmesi mümkün değildir. Bu gibi bazı durumlarda enzim aracılığı sayesinde (Fotolizaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) gerçekleştirilen tek basamaklı reaksiyonlar hasarın onarılmasına yardımcı olur. Siklobütan pirimidin dimerlerinin (CPDs), fotolizaz enzimi tarafından ayrılmasıyla hasar giderilir. Bu reaksiyona fotoreaktivasyon adı verilir. CPD fotolizazlar mantarlarda, bitkilerde, bakterilerde ve çoğu omurgalılarda bulunur. Fakat plesantalı memelilerde bulunmaz (Geoffrey and Robert 2006).

b) O-6-metilguanin tamiri

O-6-metilguanin, alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O-6-metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃

gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır (Onur *et al.*2009).

c) Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

Peroksidler ya da X ışınları bir takım ajanlar DNA zincirleri üzerinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Oluşan bu basit kırıklar DNA ligaz enzimi sayesinde hemen onarılmaktadır. Enzim, enerji gerektiren bir reaksiyon ile 3'OH grubu ile 5'fosfat grubu arasındaki bağı oluşturarak onarımı gerçekleştirirler (William and Michael 2002, Geoffrey and Robert 2006).

2.2.2. Kesip çıkarma onarımı (Eksizyon)

Bu onarım tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan çok önemli bir onarım sistemi olup 3 temel basamak içerir. Eksizyon onarım mekanizmasında DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir (Kulaksız ve Sancar 2007).

- 1) Hata veya hasar tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesilip çıkartılır.
- 2) DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.
- 3) DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır (Slupphaug *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2009).

a) Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

DNA'da oluşan hasarın doğrudan geri döndürülmesinde, bazlarda oluşan her kimyasal değişiklik kendine has bir tamir mekanizması gerektirir. Ancak, hücreler birçok kimyasal hasar tipini düzeltebilecek genel bir onarım mekanizmasına gerek duyarlar. Bu olay eksizyon onarımıdır. Hasarlı olan ve yanlış yerleştirilen bazları uzaklaştırmak için kullanılan tamir mekanizmasına eksizyon denir. Her bir yanlış baz tipine has bir çok

yolak vardır. Bunlar ikinci ve üçüncü basamaklar ortak olmak üzere üç adımdan meydana gelir (Frosina *et al.* 1996).

1. Yanlış bazın uygun olan bir DNA N-glikozilaz sayesinde uzaklaştırılması ve bir AP bölge oluşması. AP bölgeleri kendiliğinden kaybolan veya glikozilaz etkisiyle uzaklaştırılan DNA bölgeleridir. Bir memeli hücresi bir gün içerisinde 500 pirimidin ve 10000 pürin kaybeder.

2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılır ve de AP bölgesine komşu olan bir 3'-OH oluşturulur.

3. AP bölgesi kesilerek çıkarılıp (excision) uzaklaştırılır. DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucu uzatılır.

DNA N-glikozilazlar bunlardan farklı olarak AP ligaz aktivitesine de sahiptirler. Bu sayede AP bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler. Bir sonraki adımda AP endonükleazları 5' fosfodiester bağını hidroliz ederler. Böylece uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozu uzaklaştırırlar. Son olarak ise DNA polimeraz (polimeraz- β) tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır (Frosina *et al.* 1996).

b) Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

Mikoplazmalardan memelilere kadar olan bir yelpazedeki organizmalar tarafından kullanılan, DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturup pek çok çeşit hasarı tanıyabilen bir tamir mekanizmasıdır (Amundson *et al.* 2002). NER mekanizması şöyle işlemektedir:

1. Hasarın tanınması
2. Protein kompleksinin hasarlı olan bölgeye bağlanması
3. ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragment içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı olan zincirin kesilmesi (incision)
4. Degradasyon (hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılması)

5. DNA sarmalı üzerinde oluşan boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması (polimerizasyon)

6. Ligasyon

Yeterince işlev görmemesi halinde yaşlanma, kanser oluşumu, çeşitli kalıtsal ve nörodejeneratif bozukluklar ile sonuçlanır. Kalıtsal sendromları (Xeroderma pigmentosum/XP, Cockayne syndrome/CS, Trichothiodystrophy/TTD) olan bireylerde NER mekanizmasında bozukluklar belirlenmiştir (Bohr 1995, Norbury and Hickson 2001).

c) Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

Yanlış eşleşme tamiri normal şekilde eşleşmesi gereken bazların hatalı eşleşmesinden kaynaklanan, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan hataları düzeltir. *E. coli*' yi örnek aldığımızda, 7 proteinden meydana gelen bir sistem tarafından hatalı eşleşmenin belirlendiğini görürüz. Bu proteinler mutL, mutS, mutH, uvrD, ekzonükleaz I, SSB ve DNA polimeraz III' tür. *E. coli* DNA'sına bakılırsa, (5')GATC dizisindeki adeninlerin özel bir metilaz olan "Dam Metilaz" tarafından metillendiği belirlenir. Replikasyon sırasında kalıp zincir metillenmiş olmasına rağmen yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık gecikme ile metillenir. Bu zaman zarfında mutS, yeni zincirde hatalı eşleşen bazları belirler. Sırasıyla mutL, ve mutH bir kompleks oluşturmak için sisteme katılırlar, DNA boyunca çift yönlü olarak metillenmemiş bir GATC bulununcaya kadar hareket ederler. MutH' deki endonükleaz fonksiyonu metil grubunun karşısındaki metillenmemiş zincire bir çentik atmak için aktive olur. Metillenmemiş zincir, SSB, endonükleaz I ve uvrD helikaz'ın birlikte hareketi sayesinde uzaklaştırılır. DNA polimeraz III doğru DNA zincirini yeniden oluşturur ve ligasyon ile tamir sona erer. GATC bölgesi ile hatalı olan eşleşmenin arasındaki uzaklık en fazla 1000 baz çifti olabilir. Bu yüzden yanlış eşleşme tamiri etkili bir tamir mekanizması değildir.

Ökaryotlar, *E. coli*' de bulunan mut proteinlerine homolog olan proteinlere sahiptirler. Fakat yeni sentezlenen zinciri ayırmak için *E. coli*'ye özgü metilasyon işlemi yerine

kullanılan mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Yanlış eşleşme tamir mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal nonpolipozal kolon kanserine (HNPCC) yatkın oldukları tespit edilmiştir (Schofield and Hsieh 2003, Stojic *et al.* 2004).

2.2.3 Rekombinasyonel Tamir

DNA'ların zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı durumda kullanılan ve replikasyondan sonra aktif olan bir onarım mekanizmasıdır. Timin dimeri gibi bir lezyonu içeren DNA replike olurken DNA polimeraz önce lezyonda duraklar ve yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak lezyonun üzerinden atlar. Bu boşluğa bir yanıt olarak RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi ile başlangıçta hasarsız komplementer dizide bulunan bir segmenti bu boşluğa sokup onu tamamlar. Bu işlem "verici" zincirde bir boşluk bırakır. Bu boşluk daha sonra doldurulur.

2.2.4. SOS Tamiri

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer onarım mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. Hücrelerde çok ciddi DNA zararlarına karşı acil yanıt olarak DNA onarım enzimlerinin sayısının artmasıdır. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısındanda replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Fakat replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilir. Bu nedenle hataya meyilli sistem de denir (William and Michael 2002, Geoffrey *et al.* 2006).

2.2.5. DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

DNA çift kırıklarının kaynakları arasında topoizomeraz inhibitörleri (etoposid, adriamisin) deiyonize radyasyon ve V(D)J rekombinasyonu sayılabilir. DNA çift zincir kırıkları, DNA hasarlarının en yıkıcı şeklidir. Bu kırıklar tamir edilmezse kromozomların kırılmasına ve hücre ölümüne kadar varan sonuçlar doğurabilir. Yanlış

tamir edilmesi halinde ise kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir: (Haber 2000)

1. Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog and Joining) (NHEJ)
2. Homolog rekombinasyon (HR)

1. Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog and Joining) (NHEJ)

Ku 70-Ku 80 (DNA- bağımlı protein kinaz katalitik subunit) kompleksleri DNA'nın kırık olan uçlarına bağlanır. DNA bağımlı protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin de hasar bölgesine gelmesini sağlar. Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kırık uçlarına bağlanmasına olanak sağlar (Zhang *et al* 2009). Bu işleyiş homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanmasının biyokimyasal bir yoludur. Çünkü kırık DNA uçları bağlanabilir bir durumda olamayabilir ve bu yol bazen genetik bilgide kayıplara neden olur. Homolog olmayan uç bağlanmasındaki hatalar iyonize radyasyon duyarlılığına ve immün yetersizliğe neden olur (Delebeç ve Kantarcı 2006).

b) Homolog Rekombinasyon (HR)

DNA çift zincir kırıkları, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığı ile tamir edilir. Maya da bu yöntem çift zincir kırığı tamirinde baskın olarak kullanılır. İnsanda homolog olmayan uç bağlanması ile eşit öneme sahiptir (Haber 1999,2000).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Bir serbest radikal, bir veya daha fazla sayıda çiftleşmemiş elektrona sahip olan ve kendiliğinden meydana gelebilen kimyasal türler olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller son derece kararsız olan moleküllerdir. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$), alkoksil ($RO\cdot$) ve nitrik oksiti ($NO\cdot$) kapsayan oksijen merkezli serbest radikal örnekleri ve singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorit ($HOCl$) gibi radikal olmayan türler reaktif oksijen türleri (ROS) olarak kabul edilirler (Pietta 2000). ROS'lar ya en az bir tane çiftleşmemiş elektron içeren radikallerdir ya da biyomolekülleri oksitleme kabiliyetine sahip olabilen reaktif radikal olmayan bileşiklerdir. Bu yüzden bu ara ürünler ayrıca oksidant ya da pro-oksidant olarak isimlendirilirler (Halliwell and Gutteridge 1989, Sies 1991). ROS'lar normal fizyolojik olaylar süresince sürekli olarak oluşturulurlar ve lipid peroksitlerin birikmesine sebep olan membran lipidlerinin peroksidasyonunu kolaylıkla başlatabilirler (Elmastaş *et al.* 2006, Gülçin 2010).

Reaktif olan moleküller kararlı hale geçebilmek için elektron ararlar ve diğer moleküllerden elektron kopararak kararlı hale gelirler. Radikaller, yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, genom instabilitesi ve kanser gibi pek çok oluşumda rol almaktadır (Caporaso 2003).

Aerobik (oksijenli solunum yapan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine karşı koyabilmek amacıyla antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen ortadan kaldıramaz. Bunun sonucunda oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Serafini and Del Rio 2004).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak ortaya çıkarlar. Endojen etmenler organizmalarda normal olarak gerçekleşen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında stres, virüsler, enfeksiyon, paraquat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma,

pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği oluşturan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, hiperbarik oksijen, trisiklik antideprasanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 ve PCB (poliklorlubifenil)'ler örnek verilebilir (Fraga *et al.* 1990, Halliwell 2000, Williams and Jeffrey 2000, Ates *et al.* 2004, Burçak ve Andican 2004, Siomek *et al.* 2006).

Canlı organizmada ortaya çıkabilen radikallerin sayısı yüzlerle ifade edilse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikallerinin özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller içerisinde bulunabilir. Çünkü nitrik oksit ve süperoksit enzimatik mekanizmalarla, süreli ve önemli miktarlarda üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde, bildiğimiz diğer tüm önemli radikaller ile radikal olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek niteliktedirler (Kılınç ve Kılınç 2002).

Çizelge 2.3.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri (Dündaroz vd. 2003).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H [•]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH [•]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂ ⁻	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif etkili
Perhidroksi radikal	HO ₂ [•]	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO ⁻	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Tiol radikali	RS [•]	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin

		genel adı
Alkoksil	RO•	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Azot dioksit	NO ₂	NO'ın oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri adı da verilmektedir (Gülbahar 2007). Reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan formlardır (Nawar 1996).

Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine bozulması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. Günde 103 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülen DNA'nın yanı sıra, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler de oksidatif hasara uğramaktadırlar (Burçak ve Andican 2004).

Serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları engelleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere antioksidan adı verilir (Eliot 1999). Antioksidanlar, mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha da zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikallerin oluşumunu engelleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan grubunda bulunan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme kabiliyetindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipitler gibi hücrel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırarak bir hücrel bölgeden diğer bir hücrel bölgeye geçişini de engelleyebilmektedirler (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller ve benzeri gibi olan bileşiklerdir (Ou *et al.* 2002). Fakat bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin etkisini tamamen ortadan kaldıramaz. Ve oksidatif stres adı verilen durum ortaya çıkar (Serafini 2004).

Serbest radikaller, hücrelerde lipid, DNA, enzim, karbonhidrat ve protein gibi tüm önemli organik moleküller üzerinde etkilidirler. Serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan organik moleküller lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu biçiminde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^{*}) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^{*}) meydana gelmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) sebep olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" olarak tanımlanır (Haber and Weiss 1984).

Lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri, hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali özelliği kazanması ile başlar. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılması için geçiş metalleri iyon katalizine ihtiyaç duyulmaktadır. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının tamamıyla uyarılabilir. Bu durum geçiş metallere varlığında daha da artar. LOOH yıkıldığında büyük çoğunluğu biyolojik anlamda aktif olan aldehitler meydana gelir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer kısımlarına da mevcut olan hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla birlikte lipid hidroperoksidasyonunun derecesiyle iyi bir korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit düzeylerinin indikatörü olarak kullanılır. Enzimatik olmayan lipid hidroperoksidasyonu oldukça zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle, dolaylı olarak da diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Ayrıca doku hasarına ve pek çok hastalığa da sebep olmaktadır (Tietz 1995).

Proteinler çoklu doymamış yağ asitlerine göre, serbest radikallere karşı daha az hassasiyet gösterirler. Proteinlerin serbest radikal zararlarından etkilenme derecesi amino asit dizilişlerine bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitlere sahip olan proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Etkilenme sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikalleri meydana getirir. Serbest radikallerin etkileri sonucunda, immünoglobülin G ve albümin gibi yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve bu sayede normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. ROS üreten reaksiyonlara maruz kalan lizin ve prolin aminoasitleri nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin de serbest radikallerin etkilerinden büyük oranda zarar görür. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ya da hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumunu sağlar (Burtis and Ashwood 1999).

Serbest radikallerin DNA'da meydana getirdiği hasar oldukça önemlidir. DNA'yı etkileyip mutasyona ve hatta ölüme neden olurlar. Hidroksil radikali (OH^*) bazlar ve deoksiribozla kolaylıkla reaksiyona girer ve değişikliklere sebep olur. Aktifleşmiş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Mathers *et al.* 2004).

Karbonhidratlar üzerinde de serbest radikallerin önemli etkileri vardır. Otooksidasyon sonucu monosakkaritlerden; hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliği bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu sebeple yaşlanma olaylarında ve kanserleşmede önemli bir etkendirler (Akkuş 1995).

Oksidatif DNA hasarının yaşlanmada, Alzheimer hastalığında, diabette, aterosklerozda, romatoid artrit ve sistematik lupus eritematozus gibi otoimmün inflamatuvar hastalıklarda ve kanser durumunda arttığını gösteren pek çok araştırma mevcuttur (Burçak ve Andican 2004).

2.4. Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Fitokimyasallar

Son zamanlarda insanların bitkisel ilaçlara ve doğal bileşiklere olan ilgisi, giderek artmaktadır. Tamamlayıcı ya da alternatif tıbbın kullanımı, bu bitkilerin faydalarına inanan çok sayıda insanla birlikte son derece büyük oranda bir artış göstermiştir. Şifalı bitkiler dünya çapındaki reçeteli ilaçların %40' ının temelini oluşturmaktadır (Zheng and Wang 2001).

Epidemiyolojik çalışmalar meyvelerin, sebzelerin ve tüm tahılların düzenli olarak tüketilmesinin böylece fitokimyasalların kanser, koroner kalp hastalığı, diyabet, yüksek kan basıncı, enflamatuvar, viral ve parazitik hastalıklar, psikotik bozukluklardaki yararlı etkileri ortaya konmuştur (Pada 1995, Dillard and German 2000, Silva *et al.* 2005, Tosetti *et al.* 2009).

Oksidatif hasarlar değişik mekanizmalarla birlikte tümör oluşumunda rol oynarlar. DNA hasar görürse ve onarılmazsa mutasyonlar, tek veya çift zincir kırıkları, kromozom kırıkları ve kopan parçaların farklı yerlere yapışması gibi durumlar gözlenebilir. Serbest radikallerin ortaya çıkardığı oksidatif stresin engellenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi amacıyla yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir (Liu 2003, Prior 2003).

Tıbbi bitkilerde bulunan etken maddeler insan sağlığı açısından önem taşıdığından bu maddelerin sentetik yolla elde edilmesine eskiden beri çalışılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu bunlardan bazılarının sentetik olarak elde edilmesi zamanla tıbbi bitkilerin kullanım alanlarını geriletmiştir. Ancak bu bitkilerdeki etken maddelerin yeni kullanım alanlarının bulunması bu bitkilerin değerini arttırmıştır. Bugün, yaşama standartlarına göre kullanılma ve üretim amaçları değişiklik göstermektedir (Anon 1998).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dünya nüfusunun %60'ının sentetik ilaçları hiç kullanmadığını dörtte üçünün ise kendi geleneksel kültürlerindeki bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiğini ve bunları kullanmaya devam ettiklerini göstermiştir (Çubukçu *et*

al. 2002). Bu tedavilerin birçoğu bitki ekstraktlarının ya da onların aktif bileşenlerini kullanmaya dayanır (Craig 1999).

2.5. *Silybum marianum* L. Gaertn (Devedikeni) Bitkisi

Silybum marianum (Meryemana diken bitkisi) Asteraceae (=Compositae) familyasına ait olan bir bitkidir. Ülkemizde doğal olarak yetişenleri ve kültürü yapılanları tek yıllıktır. Bitki 1–1,5 m yüksekliğindedir ve gövdesi köşeli seyrek tüylü otsu bir bitkidir. Çiçekleri; baş şeklinde olup bir arada toplu görünüm sergilerler. Meyveleri 3-5 cm kadar uzunlukta olup, koyu renkli, çiçekleri mor ve beyaz renkli uç kısımlarında 15 mm kadar uzunlukta olan bir tüy demeti mevcuttur. Yaprakları yeşil-beyaz karışımlı renk gösterir. Tohumu; koyu renkli, oval ve ortalama 6 mm uzunluğundadır.

Bu bitki Almanya’da Meryemana’yı andıran bir dinsel sembol olarak görüldüğünden dolayı ona bu ad verilmiştir. Kızılderililer ise bu bitkiye Deve Dikeni, Kutsal Diken, Okunmuş Diken olarak isimlendirmişlerdir.

Meryemana diken ile ilgili araştırmalar yaklaşık olarak 50 yıl önce 1958’de başlamıştır. 10 yıllık bir araştırmanın sonunda ise Münih üniversitesinden H.Wagner başkanlığındaki bir araştırma ekibi silimarin olarak bilinen bir bileşiği tohumlarından ayırmayı başarmışlardır. Meryemana Dikeni tohumları % 1–6 oranında silimarin ihtiva etmektedir. Günümüzde Amerika ve Avrupa’da üretilen yoğunlaştırılmış meryemana diken ekstreleri %70– 80 oranında silimarin ihtiva eder. Silimarin, meryemana diken bitkisinin tohumlarında bulunan farmakolojik olarak aktif, silibin (silibinin), izosilibin, silidianin, silikristin, taksifolin ve dehidrosilibinin gibi flavonolignanlardan oluşmaktadır (Sanchez-Sampedro *et al.* 2008). Saflaştırılmış ekstraktı, silimarin flavonolignanların yaklaşık %70–80’ ini içeren *S. marianum* tohumlarından elde edilmiştir ve yaklaşık %20–30 oranında kimyasal olarak belirlenmemiş, çoğunlukla polimerik ve okside olmuş polifenolik bileşiklerden meydana gelmektedir. Silimarin bileşiğinin asıl elemanı ise silibindir (Simanek *et al.* 2000).

Bu bitkinin bileşiminde karaciğeri koruyucu olan etken maddeler ve de kendine has diğer maddeler bulunmaktadır. Bunlar; flavonolignandan oluşan silimarin, taksifolin, kuarsetrin, albumin, müsilaj, sabit yağ ve acı maddelerdir. Meryemana diken ekstreleri

%70–80 silimarin içerdikleri için antioksidan etki göstererek karaciğeri serbest radikallerin zararlarından korur. Aynı zamanda karaciğer hormonlarının, ilaçların ve kimyasalların zararsız hale getirilmesinden de sorumludur. Tohumları; %25–30 sabit yağ, nişasta, tanen, silimarin (silibin, silidianin ve silisiristin) ihtiva etmektedir. Silimarin bileşiklerinin karaciğer hücrelerinde ribozomal RNA moleküllerini uyararak protein sentezini arttırdığı düşünülmektedir (French 2004). Aynı preparatlar mantar zehirlenmelerinde amonitin ve folloidin alkaloidlerinin karaciğerde zehir etkisini engelleyici olarak da kullanılmaktadır. Meryemana dikenli bitkisinde bu maddelerin yanında, tiramin, flavonid, histamin, reçine, amin, albümin, agmatin maddeleri de bulunmaktadır (Tanker 2003).

Tohumları yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir bitki olup modern araştırmalar ve çalışmalar sonucunda karaciğer hastalıkları üzerine olumlu etkisinin ispatlanmış olması, geleneksel bilgilerin de doğru olabileceğinin son derece ilginç bir örneğidir (Acartürk 1996, Singh *et al.* 2004).

Deve dikenli, Avrupa’da hepatit, safra bozuklukları ve hatta böbrek toksisitesine karşı korunmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Devedikenli, karaciğeri *Amanita* mantarı, asetaminofen ve alkol de dahil çeşitli hepatotoksinlerden korur. Başlıca aktif bileşeni, çeşitli antioksidan bileşiklerinden oluşan etkili bir antioksidan olan silmarindir. Yetişkinlerde deve dikenli kullanımı ile ilişkilendirilmiş uzun vadede oluşacak risklerle ilgili bir bilgi yoktur. Pediatri, hamilelik ve emzirme esnasındaki güvenilirliği bilinmemektedir (Jane 2000). Antikarsinojenik, antioksidan, antipsöriatik, antidot, antienflamatuar, antihiperlipidemik ve hipoglisemik etkileri görülmüştür. Yağlı karaciğer sendromunda, östrojenle ilgili hastalıklarda ve safra kesesi şikâyetlerinde kullanılmaktadır. Hepatoprotektör, immunomodülatör, antiproliferatif ve antisklerotik etkileri üzerinde hala çalışılmaktadır (Barzaghi *et al.* 1990).

Deve dikenli meyvesinin dispeptik şikâyetler için kullanımı Alman Sağlık Komisyonu E tarafından onaylanmıştır. Etkili grup silimarin adı verilmiş olan komplekstir ve aynı zamanda betain içeriği de silimarinin bu etkisine destek olmaktadır. Silimarinin bileşiminde bulunan silibinin antioksidan etkisi olup, hücre membranını stabilize eder

ve bu sayede karaciğer hücrelerini korur. Lipid peroksidasyonunu engel olur. Karaciğer hücrelerinin (hepatositler) reseptörlerini bloke eder ve bu hücelere toksinlerin girişini engeller. Bunu hepatositlerde birikerek ve de yarışmalı olarak yapar. Nükleer polimeraz A enzimini aktifleştirir, ribozomal protein sentezini artırır. Yeni hepatositlerin yapımını ve hasarlı hücrelerin rejenerasyonunu hızlandırır (Brown 1996) .

Deve dikenini, flavonolignanlarının karaciğer üzerinde iki spesifik etkisi mevcuttur. İlki silimarin, karaciğer hücresi membranına bağlanır, çevresel toksinlerin muhtemel zararlarından korur (örneğin mantar zehiri, endojen zehirler, serbest radikaller vb). İkincisi ise silimarin karaciğer hücrelerine girip karaciğer sağlığı için hayati öneme sahip olan enzimlerin yapımını artırır. Bu da rejenerasyon olayını stimüle eder (Barrite *et al.* 2002).

1990'da Avrupa'da karaciğer patoloji enstitüsü kliniğinde yapılan bir çalışmada bilim insanları deve dikenini ekstresinin hayvanları yüksek dozdaki karbon tetra klorür toksisitesinden koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Etki mekanizması olarak, önce bu maddeyi daha az toksik parçalara ayırarak karaciğerdeki solvan aktivasyonunu azaltır ve ikinci olarak da kuvvetli bir antioksidan olarak karaciğer hücrelerini toksik bileşiklerden korur. Yapılan çalışmalar sonucunda karaciğer hücrelerindeki hasarın yarı yarıya azaldığı gözlenmiştir. Bu mekanizmayla da yüksek dozda tetrasiklin, asetaminofen, salisilik asit, butirofenon, fenotiazin, halotan, dilantin, etanol, karbontetraklorür, aflatoksin ve amanitinin karaciğerde oluşturduğu hasardan korumaktadır (Saller 2001).

Karaciğer dokusu sık sık serbest radikallerin oluşturduğu hasara maruz kalır ve yağ asitleri salınır, bu yağ asitlerinin varlığı ve lökotrienlerin hasarı enflamasyona sebep olur. Yağ infiltrasyonu, karaciğerde alkol ya da diğer kimyasalların etkisi ile olabilir. Silimarin bu reaksiyonu, yağ asidi miktarını arttıran lipid yıkımını engelleyerek nötralize eder. Silimarinin varlığında yağ asidi yapımı durur, protein yapımı ise artar. Bu etki yeni karaciğer hücrelerinin sayısının artışına sebep olur. Bu stimülatör etkiyle sağlıklı hücrelerin sayısı artar, malign çoğalma gerçekleşmez (Bergner 1988).

Silimarin aynı zamanda alyuvarlarda bulunan ve diğer bir antioksidan olan süperoksit dismutazın da etkisini arttırmaktadır. İnsan plateletlerinde lipid peroksidasyonunu doza bağlı olarak inhibe edici özelliği vardır. Bu etkiler özellikle alkol alan bireylerde oldukça önemlidir. Alkol bağımlılığı immunsupresyon ortaya çıkardığı için bazı bireylerde önemli hasarlara neden olabilir. Bu yüzden alkol tüketiliyorsa antioksidan desteği almak gereklidir. Buna ek olarak eritrosit membranını lipid peroksidasyonuna ve de hemolize karşı korur. Yapılan araştırmalara göre bu bitki karoten, selenyum, E ve C vitamininden daha potansiyel bir antioksidandır (Brown 1996).

Alkol tüketimi ve viral hepatit, karaciğer hücrelerinde hasar oluşturmaktadır. Silibin ve silikristin, DNA'ya bağlı RNA polimeraz I'i stimüle edici etkisi sebebiyle, hasarlı karaciğer hücrelerinin rejenerasyonunu hızlandırır. Böylece rRNA sentezinde artış, aynı zamanda sağlam ribozomların formasyonunda da hızlanma görülmektedir. Bu sonuçlar tüm sellüler proteinlerin sentezinde artışa sebep olmaktadır. Böylece karaciğerin rejenerasyon yeteneği ortaya çıkmaktadır (Blumenthal 2000).

Silibin ya da silimarin ribozomal RNA polimeraz aktivitesini stimüle eder ve böylece hepatosit protein sentezini artırır (Blumenthal 2000).

UV radyasyonu, deri hücrelerinde oksidatif stresi artırır, ROS oluşturur, bu da kanser başlamasına sebep olur. ROS oluşum yollarını antioksidanlar engelleyebilmektedir. Yüksek kanser riski ve ileri güneş yanığında silimarin bir antioksidandır (Singh and Agarwal 2005).

Silidianin *in vitro* ortamda reaktif oksijen türlerinin salınımını engellemektedir. Polimorfonükleer nötrofiller enflamatuvar cevabın başlaması ve artışında rol oynar. Ve apoptozis mekanizması açısından önem taşır. Kaspase 3 aktivasyonunu düzenlemesi antiinflamatuvar etkisini gösterir. Bu etkisi de antioksidan aktivite yoluyla ortaya çıkmaktadır (Zielinska-Przyjemska and Wiktorowicz 2006).

Silibin antioksidan etkisini, Kuffer hücreleri tarafından nitrik oksit ve süperoksit anyon radikallerinin üretimini azaltarak ortaya çıkarır. Bununla birlikte kuffer hücrelerinin

ürettiği lökotrien oluşumunu da inhibe etmektedir. Silimarin karaciğer, mide ve barsak tarafından salgılanan glutasyon üretimini artırır. Glutasyon karaciğerdeki detoksifikasyon hücreleri tarafından kimyasal madde, hormon ve ilaçların metabolizmasında kullanılır. Silibin aşırı demir yüklenmesi ile oluşan hepatit ve mitokondrial glutasyonun oksidasyonunu azaltır. Ayrıca fosfotidilkolin sentezini stimüle edip kolinfosfotidiltransferaz aktivitesini artırır. Süperoksit anyon nitrik oksit ve radikal yapımını doz bağımlı olarak inhibe eder (Dehmlow *et al.* 1996, Gunaratne and Zhang 2003).

Bu etki 1970’li yıllardan itibaren araştırılmaya başlanmıştır. Deve dikeninden elde edilen silibin’in enjektabl formu *Amanita phalloides* zehirlenmelerinde kullanılan iyi bir antidottur ve suda çözünür. Bu mantar son derece toksiktir ve 2-5 saatte ölüme sebebiyet verir. Hipoglisemiye ve hipovolemiye neden olur. Amanitin hemorajik karaciğer atrofisine sebep olur ve sonuçta ölüm kaçınılmazdır. Çalışma yapılmadan önce bilim adamları bu kadar öldürücü bir toksine karşı bir bitkinin bu kadar koruyucu olmasını beklemiyorlardı. Zehrin karaciğerde hasar yapan 2 peptidten kaynaklandığı önceden biliniyordu. Amanitatoksin ve galaktozaminin karaciğere zararlarını RNA Polimeraz I’i inhibe ederek ortaya çıkarırlar. Bu hasarın deve dikenini tarafından önlendiği gözlenmiştir. Bitkinin etki mekanizması, silimarinin mantar toksinlerinin hepatositlere bağlanıp, oradan da enterohepatik sirkülasyona geçişini inhibe etmesine bağlıdır (Vogel 1980).

2.6. *Viscum album* L. (Ökse otu) Bitkisi:

Viscum album L., 300-2000 m yüksekliklerdeki çeşitli ağaçların ve de bazı çalılıarın üzerlerinde yarı parazit olarak yaşayan odunsu bir bitkidir (Miller 1982). Dalların üzerinde kümeler meydana getirirler ve her mevsim yeşildiler. Meyveleri Ağustos-Kasım aylarında gelişir ve yaklaşık olarak 1 cm çapındadır. Armut ve ya küre şeklinde, etli, beyazımsı, şeffaf ve de tek tohumludur. Bitki Mart-Haziran aylarında çiçek açar, sarımsı-yeşil renkli sapsız çiçekler, üçlü veya altılı gruplar halinde, aksillar veya terminaldir (Paris and Moyse 1981, Cooper and Johnson 1984).

Meyvelerinin yapışkan, kaygan ve de beyaz renkli olmasından dolayı Latince’de *Viscum album* olarak isimlendirilmiştir. Bitkiye Türkçe olarak ‘Ökse otu ’ adının verilmesi ise, kuşları yakalamak için ökse otu meyvelerinde bulunan ‘vissin’ adı verilen yapışkan maddenin, çubuklar üzerine sürülerek ökse yapımında kullanılmasından kaynaklanır (Baytop 1984, Ergun ve Deliorman 1995). Ökse otu meyvelerinin etli ve yumuşak olması, kuşlar tarafından sevilerek yenmesine sebep olur (Mandacı 1998). Bu meyveleri yiyen kuşların dışkılarıyla birlikte ağaç dalları üzerine düşen bitki tohumları ağaç dallarına yapışır ve ortamdaki ürik asit sayesinde çimlenip, gelişir (Becker 1986).

Bitki haustoryumları (emeç veya sömürme kökü) ile konakçı bitkinin dallarında bulunan ksilemlere kadar ulaşır. Konakçıdan su ve minareleri alırken, fotosentez yaparak kendi besinini üretir (Becker 1986, Ergun ve Deliorman 1994).

Ülkemizde *Viscum album* L.’un meyvelerinin yakı sakızı ile ezilmesi sonucu elde edilen karışım, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde (Gaziantep, Urfa, Van) yakı halinde romatizma ağrılarınin dindirilmesi amacıyla kullanılır. Bitkinin ezilmiş meyveleri çıiban üzerine konularak çıibanın tedavisinde de kullanılır (Baytop 1984).

Yapılan antitümör çalışmalarında çeşitli tümörler üzerinde Avrupa ökse otu (*Viscum album*), Kalifornia ökse otu (*Phoradendron villosum*) ve Kore ökse otlarından (*Viscum coloratum*) elde edilen alkaloit fraksiyonları uygulanmış ve en aktif alkaloit fraksiyonunun, Kore ökse otuna ait fraksiyon II olduğu tespit edilmiştir (Ergun ve Deliorman 1994).

Kore mistletoe lektin II’nin karaciğer kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, P-53’den bağımsız olan bir mekanizma ile lektin II’nin telomeraz aktivitesini düşürdüğü ve hücreyi apoptozise götürdüğü gözlenmiştir (Li 2002).

Kanser hücreleri olan Molt-4 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, glikolizasyon yapıları bozulmuş haptoglobulinlerin, Molt-4 hücrelerinde lektinlere karşı koruyucu bir aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Lektinlerin sitotoksitesisi serum

glükoproteinleri tarafından inhibe edildiğinden dolayı lektin içeren *V. album* ekstraktları kanserli hastalara zarar vermeden kullanılabilir (Frantz *et al.* 2000).

Lektinler, glusitlerle reaksiyona girebilme yeteneklerinden dolayı, hücre membranındaki glukoprotein, glukolipit gibi glukokonjugatlara bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma, eritrosit aglütinasyonu, lenfositlerin mitojenik stimülasyonu, tümör hücre büyümesinin inhibe edilmesine kadar çok çeşitli değişikliklere sebep olabilmektedir (Gabijs *et al.* 1994).

Viscum album'un sitotoksik proteinlerini tanımlayan madde gruplarından bir tanesi de viskotoksinlerdir. Viskotoksinlerin hücre öldürücü etkileri de mevcuttur. Viskotoksinlerin tümör hücreleri üzerindeki sitolitik etkileri disülfür gruplarıyla hücre membran fosfolipitlerinin etkileşiminden ortaya çıkmaktadır. (Ergun ve Deliorman 1994).

Viscum album meyvelerinin sulu ekstresinden asidik arabinogalaktan yapısında visik asit izole edilmiştir. Bu poliholozitin gösterdiği antitümör aktivite üç immünolojik test çalışmasıyla incelenmiştir. Arabinogalaktan, *in vitro* insan granülosit testinde, fagositoz aktiviteyi arttırmıştır. *In vivo* fare karbonklerans testinde ise klerans oranında bir artış meydana getirmektedir (Ergun ve Deliorman 1995).

V. album L. pek çok tıp otoritesi tarafından şifalı bir bitki olarak kabul edilmiştir. Günümüzde *V. album*'dan hazırlanan çok sayıda müstahzar, değişik kanser vakalarında ve bazı kalp ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Luther and Becker 1987, Liste 1994).

Avrupa da yetişen ökse otu sulu preparatları tüm bitki kullanılarak elde edilmiştir. Sitotoksik ve bağışıklık sistemini düzenleyici özellikleri vardır. Almanya ve Orta Avrupa da alışılmadık bir şekilde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Grossarth-Maticek *et al.* 2001, Mansky *et al.* 2003). Almanya da ökse otu ekstratı, kanser tedavi ilacı olarak ticari olarak kaydedilmiştir (Happle 2000).

2.7. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili tekniklerin çoğu pahalıdır ve uzun çalışma saatleri gerektirir. Çoğu zaman da pek çok laboratuvar veya üniversitenin sahip olmadığı radyoaktif çalışmalar gerektirir ve hatta tüm bu çalışmalar sonunda beklenen başarı elde edilememektedir. Tüm bu sebepler bu alanda çalışma yapılmasını zorlaştırmıştır (Tice *et al.* 2000, Gichner *et al.* 2009). Ancak son yıllarda biyoloji ve tıp alanlarında “Comet Analizi” veya “tek hücre jel elektroforezi” adı verilen yeni bir moleküler test sistemi ortaya konmuştur. Bu metot sayesinde DNA moleküllerinde hasar olup olmadığı, varsa bu hasar seviyelerinin anlaşılması ile bu alanlarda yeni boyutlar ortaya çıkmıştır (Koçyiğit *et al.* 1995, Lin *et al.* 2007, Ginchner *et al.* 2008a). Comet testi tek hücre seviyesinde uygulanabilir olması, tek ve çift zincirde ve alkali labil bölgelerde DNA hasarının ölçülmesinin yanında, spesifik endonükleaz lezyonlarının tanımı, UV’ye maruz kalmış pirimidin dimerlerini, oksidize bazları ve alkalizasyon hasarlarını belirlemesi sebebiyle de yaygın olarak tercih edilmektedir (Tice *et al.* 2000).

Comet yönteminin temel prensibi fiziksel ve kimyasal sebeplerle meydana gelen sitotoksik ve genotoksik ajanların canlı hücrelerdeki etkilerini, alkali pH’da farklı molekül ağırlıklarına ve elektriksel yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri prensibinden yola çıkarak tespit etmektir. Genel anlamda canlı dokulardan izole edilen çekirdekteki DNA, ince bir agaroz jel içine gömülür. Deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olan lizis solüsyonunda lizis olmaları sağlanır. Sonrasında elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer DNA üzerinde oluşan hasarlar tamir mekanizmalarıyla tamir edilmemiş, tek veya çift zincirleri üzerinde kırılmalar meydana gelmişse, kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda birbirlerinden farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri etidyum bromür gibi boyalarla boyanıp floresan mikroskopta incelendiğinde hasar derecesine göre DNA’lar küresel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görünürler. Bu yüzden yönteme İngilizce de “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir (Ostling and Johanson 1984, Singh *et al.* 1988, Horoz *et al.* 2006, Lin *et al.* 2007, Dikilitaş *et al.* 2009, Gichner *et al.* 2009).

Rydenberg ve Johanson, insan hücrelerinde ilk kez DNA tek sarmal kırıklarının tespitini gerçekleştirmişlerdir. Hücreleri proteinlerden, DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında, lam üzerindeki agarozta gömülmüş hücreleri lizise uğratarak ayırmışlardır. Sonrasında nötralize edip akrinin oranj ile DNA'yı boyamışlardır ve kırmızı flörosana yeşilin oranını hesaplamışlardır. Yeşil flörosan çift sarmalı, kırmızı flörosan tek sarmalı göstermektedir. Ancak bu yöntem yaygın olarak kullanılmamıştır (Fairbain *et al.* 1995). Ostling ve Johanson tarafından 1984'te nötral teknik modifiye edilerek hücredeki DNA hasarının direk gösterilmesinde "Microgel Electrophoretic Technique" olarak sunulmuştur.

Comet assay, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, düşük düzeydeki DNA hasarını gösterebilmesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, fazla ekipman gerektirmemesi, değişik hücre ve doku grupları ile çalışmaya imkan vermesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilip değerlendirilebilmesi, ekonomik ve güvenli olması sebebiyle giderek yaygın hale gelmektedir (Singh *et al.* 1990). Ayrıca bu tekniği *S. cerevisiae* hücrelerinde kullanmak pek çok avantaj sağlar. Çabuk gelişen bir organizma olması, kültürünün ucuz ve kolay elde edilebilir olması bu organizmanın kullanılmasında önemli avantajlar sağlar (Rank *et al.* 2009). Ayrıca insanlarda çeşitli hastalıklarla ilgili olan genlerin yaklaşık %30'u maya genleri ile eşleşmektedir. İnsan hücrelerinin tersine, maya genleri moleküler biyoloji teknikleri ile kolayca manipüle edilebilmektedir (Silva *et al.* 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Hassas Terazî (AND)
2. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
3. Floresan mikroskop (Olympus)
4. ± 4 °C Buzdolabı (Altus)
5. -20°C Derin dondurucu (Arçelik)
6. Vorteks (Nüve NM 110)
7. Pipetler (0,5-2 µL, 0,5-100 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL) (Gilson)
8. Otoklav (Nüve ot 032)
9. Distile su cihazı (Nüve)
10. Elektroforez düzeneği (Biolab)
11. Elektroforez güç kaynağı (Power Pack P 25)
12. Hotplate (Thermolyne)
13. pH metre (Hanna Instruments)
14. İnkübatör (Heraeus)
15. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
16. Etüv (Dedeoğlu)
17. Lam(26x76mm) ve Lamel (24x60mm) (İso Lab)
18. Spektrofotometre (Jenway 6305)

3.1.2. Kullanılan Test Mikroorganizması

Bu çalışma aynı zamanda Yeast Comet Assay olarak da adlandırılmaktadır. Portekiz Minho Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden elde edilen haploid *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 suşu (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) ilgili tüm deneylerde kullanıldı.

3.1.3. Test İçin Kullanılan Bitki Materyali

Bu çalışmada *Silybum marianum* türünün ticari etken maddesi Silibinin (Sigma SO 417) ve Helixor Pini (HelixorR P*) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1. Normal kaynama dereceli agar (NMA) (%1)

NMA (Sigma, A 4718)	0,02 g
Sorbitol tamponu	2,00 mL

Belirtilen miktarlarda alınan maddeler kaynayanaya kadar ateşte bekletildi ve homojen bir çözelti elde edildi. Sıcak bir şekilde ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayıldı.

3.1.4.2. Düşük kaynama dereceli agar (LMA) (%1)

LMA	0,02 g
Sorbitol tamponu	2,00 mL

Miktarları verilen maddeler ateşte kaynatılarak homojen bir çözelti elde edildi. Hücrelerin agaroz jele tutunmasını sağlamak amacıyla NMA ile kaplı olan lamellere ılık bir şekilde yayıldı.

3.1.4.3. Sorbitol Tamponu

1 M sorbitol (Sigma, S 0900)	18,20 g
25 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, 1.04871)	0,34 g

Verilen miktarlarda alınan maddeler distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. pH derecesi 6,5 olarak ayarlandı ve Comet yöntemi esnasında hücrelerin yıkanması işlemi için kullanıldı.

3.1.4.4. Litikaz Tamponu

Litikaz (Sigma, L 2425)	0,01 gr
Sorbitol Tamponu 2x	2500,00 µL
Deiyonize H ₂ O	1500,00 µL
β-merkaptöetanol (Sigma, M 7522)	20,00 µL

Belirtilen miktarlardan elde edilen karışım 5 mL'dir. Comet yöntemi esnasında, maya hücre duvarının parçalanması ve sferoplastların elde edilmesi için kullanıldı.

3.1.4.5. Lizis Tamponu

30 mM NaOH (Sigma, 06203)	0,24 g
1 M NaCl (Sigma, 13423)	11,72 g
% 0.05 Lauril sarkozin (Sigma, L 9150)	0,10 g
50 mM EDTA (Sigma, E 5134)	0,72 g
10 mM Tris-HCl (Sigma, T 3253)	0,315 g

Verilen maddeler tartıldı ve distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'ı 10 olarak ayarlandı. Hazırlanan çözelti hücreleri lizis etmek amacıyla kullanıldı.

3.1.4.6. Elektroforez Tamponu

30 mM NaOH	0,60 g
10 mM EDTA	1,80 g
10 mM Tris-HCl	0,78 g

Miktarları verilen maddeler distile su ile 500 mL' ye tamamlandı. Çözeltinin pH değeri 10 olarak ayarlandı.

3.1.4.7. H₂O₂ Çözeltisi

% 35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9,7 µL alındı. +4°C 'de 991,3 µL distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Böylece 0,1 M H₂O₂ çözeltisi hazırlanmış oldu. Deney gününde 0,1 M H₂O₂ çözeltisinden 1 mL alınıp +4°C 'de 20 mL ye tamamlanarak 5 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

3.1.4.8. Etidyum Bromür Çözeltisi:

10 mg etidyum bromür 50 mL distile suda çözdürüldü ve 200 µg/mL stok etidyum bromür çözeltisi elde edildi. Hazırlanan stok çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 mL alındı ve distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. 20 µg/mL'lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

3.1.4.9. Silibinin

Sigma SO 417 kullanılarak %5'lik çözelti hazırlanmış ve çözücü olarak DMSO kullanılmıştır.

3.1.4.10. Helixor

Helixor Pini (Helixor^R P*) kullanılarak %5'lik çözelti hazırlanmış ve çözücü olarak DMSO kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan Besi Yerleri

3.1.5.1. Katı ve Sıvı Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besi Yeri

	Katı YPD Besi Yeri	Sıvı YPD Besi Yeri
Maya ekstratı (Fluka, 92144)	0,25 g	0,25 g
Pepton (Fluka, 70173)	0,50 g	0,50 g
Dekstroz (Sigma, D 9434)	0,50 g	0,50 g
Agar (Sigma, A 1296)	0,50 g	-

Miktarları verilen maddeler tartılarak distile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Hücrelerin üretilmesi işlemi için kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* Maya Suşunun Saklanması ve Üretilmesi

S. cerevisiae suşu hazırlanan YPD katı besiyerine ekildi. Katı YPD besiyerinde gelişen hücreler Sıvı YPD besiyerine aktarıldı. Çalkalayıcı etüvde 200 rpm'de 30°C'de geliştirildi. Spektrofotometrede Optik densite (OD) değeri 600 nm oluncaya kadar beklendi.

3.2.2. Maya Hücrelerinde Comet Yöntemi ile Silibinin ve Helixor'un DNA Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi

Maya hücreleri sıvı YPD besi yerinde geliştirildi. OD 600 değeri uygun yoğunluğa geldiğinde (1.8) 1000 µl alınıp ependorflara aktarıldı. Ependorflar, 5000 rpm'de, +4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi ve sonrasında aynı miktar deiyonize su ile +4°C'de yıkandı. Süpernatant kısmı atılarak, Pellet yine aynı miktardaki Sorbitol tamponu ile süspansiyon edildi. Pellet 1 mL alınarak 15000 rpm'de, +4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet, 250 µL, Litikaz tamponunda süspansiyon edilip, sferoplastları elde etmek amacıyla, 200 rpm'de, 30 °C'de, 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Litikaz tamponundaki sferoplastlar, kullanacağımız slayt sayısı kadar ependorf tüplerine, her tüpe 80 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Pellet 100 µL, % 1 oranında LMA ile 35 °C'de süspansiyon edildi. Daha sonra bu karışım, önceden hazırlanmış, üzerlerine % 1 oranında, 135 µL NMA yayılmış olan cam slaytlara alındı ve lamel ile kapatılarak yayılması sağlandı. Bu noktadan sonra tüm aşamalar 4°C'de yapıldı. Lameller slaytlardan kaydırılarak alındı (negatif kontrol). Etkin madde (1 µg/mL ve 10 µg/mL) belirlediğimiz slaytların üzerindeki jellere 20 µL yayıldı. Slaytlar lamellerle tekrar kapatılarak jeller katılaşması için buz kasetlerinin üstünde 30 dk. bekletildi ve sonrasında lameller slaytlardan kaydırılarak alındı. Bir sonraki aşamada, pozitif kontrol olarak kullandığımız ve sadece oksidan solüsyonu içerecek olan slaytlar üzerine ve etkin maddenin uygulandığı slaytlara ise 300 µL H₂O₂ (5 mM) yayıldı. 5 dakika beklendikten sonra, jeller Sorbitol tamponu ile yıkandı ve Lizis solüsyonu içine

alındı. 1 saat 15 dakika sonra solüsyondan çıkarılan slaytlar elektroforez tamponu ile yıkandıktan sonra, yine bu tampon içinde 20 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda 300 mA, 25 V 'ta 20 dakika minimal ışık altında yürütme işlemine geçildi. Slaytlar son olarak 65 µL Etidyum bromür ile boyandı. DNA hasarı Floresan Mikroskopta (Olympus) gözle değerlendirildi. Her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0 maksimum hasar olan DNA'lar 4 olarak değerlendirildi. Hasar birimi olarak "Arbitrary Unit" (AU) kullanıldı (Marques 2009).

3.2.3. Maya Hücrelerinde Comet Yöntemi ile Silibinin ve Helixor'un DNA Hasarı Üzerine Tamir Edici Etkisi

Sıvı YPD besiyerinde geliştirilen maya hücreleri OD 600 değeri uygun yoğunluğa gelince 1000 µl alınıp 3 ependorfa aktarıldı. Ependorflar, 5000 rpm'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi ve aynı miktar deiyonize su ile +4°C'de yıkandı. Süpernatant atılarak, Pellet yine aynı miktardaki Sorbitol tamponu ile süspanse edildikten sonra, 1 mL alınarak 15000 rpm'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 250 µL, Litikaz tamponunda süspanse edildikten sonra, sferoplastları elde etmek amacı ile 200 rpm'de, 30 °C'de, 60 dakika beklemeye bırakıldı. 5000 rpm 'de 4 °C 'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet 1000 µL dH₂O ile tekrar 5000 rpm 'de 4 °C 'de 2 dakika santrifüj edildi. 2 ependorftaki hücrelerin süpernatant kısmı atılarak pelet üzerine 1 mL H₂O₂ konuldu. Kalan 1 ependorfa 1 mL dH₂O eklendi. H₂O₂ konulan ependorflar 5 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm 'de 4 °C 'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pelet üzerine 500 µL dH₂O konularak H₂O₂ ortamdan uzaklaştırıldı. H₂O₂ ile muamele edilen ependorflara 250 µL hücre kültüründen alınarak, etken madde (1 µg/mL ve 10 µg/mL) olacak şekilde 2 ependorfa aktarıldı. Ependorflar 30 dakika 37 °C 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 20 µL hücre kültürü ve 100 µL LMA ile karıştırılarak NMA yayılmış slaytlar üzerine yayıldı. Slaytlar lamellerle tekrar kapatılarak jeller katılaşması için buz kasetlerinin üstünde kısa bir süre bekletildi ve sonrasında lameller slaytlardan kaydırılarak alındı. Lizis solüsyonuna alınan slaytlar 1 saat 15 dakika bekletildi. Elektroforez tankına alınan slaytlar 20 dakika elektroforez tamponunda bekletildi. İnkübasyon sonunda 300 mA, 25 V'ta 20 dakika

minimal ışık altında yürütme işlemine geçildi. Slaytlar son olarak 65 µL Etidyum bromür ile boyandı. DNA hasarı Floresan Mikroskopta (Olympus) gözle değerlendirildi. Her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0 maksimum hasar olan DNA'lar 4 olarak değerlendirildi. Hasar birimi olarak "Arbitrary Unit" (AU) kullanıldı (Marques 2009).

3.2.4. Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerin Ölçülmesi

3.2.4.1. Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Çalışmada kullanılan etken maddelerin total oksidan seviyelerinin ölçülmesi amacıyla hazır kit kullanılmıştır (Rel Assay Diagnostic, RL0024). Kullanılan kitin çalışma prensibi şu şekildedir:

Ferroz iyon-o-dianisidine kompleksini, örnekte bulunan oksidanlar, ferik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. H₂O₂ standart olarak kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir (Erel 2005).

Hazır kitte bulunan bileşikler:

- Reagent 1 (Assay Buffer): 50 mLx1
- Reagent 2 (Prokoromojen Çözeltisi): 10 mLx1
- Standart 1 (Kör çözelti)
- Standart 2 [Stabil stok standart çözelti (SSSS)] (800 Mm H₂O₂ Equiv./L)

İlk olarak standart çalışma solüsyonu hazırlanır. SSSS 40.000 kar deiyonize su kullanılarak seyreltilir. 50 µL SSS 10 mL deiyonize suya ilave edilerek vortekslenir. Hazırlanan bu solüsyondan 50 µL alınıp tekrar 10 mL deiyonize suya eklenir. Son konsantrasyon olarak ise elimizde 20 µM H₂O₂ bulunur.

Örnekler bu aşamadan sonra sulandırılır. 500 µL Reagent 1 boş tüplere konularak üzerlerine 75 µL örnek ilave edilir. Standart 1 olarak kullanılacak tüpe 500 µL Reagent 1 ve 75 µL deiyonize su ilave edilir. Standart 2 tüpüne ise 75 µL seyreltilen H₂O₂ 'dan eklenir. 530 nm'de ilk absorbanslarına bakıldıktan sonra tüm örneklerin üzerlerine 25 µL Reagent 2 ilave edilir. Sonra 5 dakika, 37 °C 'de bekletilerek ikinci absorbans değerleri ölçülür. Sonuç verilen formül yardımıyla hesaplanır:

Total Oksidan Seviyesi (TOS): (ΔAbs.örnek / ΔAbs.standart2) x 20

Δ: ΔAbs.2- ΔAbs.1

3.2.4.2. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Çalışmada kullanılan etken maddelerin total antioksidan seviyelerinin ölçülmesinde hazır kit kullanılmıştır (Rel Assay Diagnostic, RL0017). Kullanılan kitin çalışma prensibi ise şu şekildedir:

ABTS radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak koyu mavi-yeşil renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç gösterir ve total antioksidan seviye hakkında bilgi verir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (Erel 2004).

Hazır kitte bulunan bileşikler:

- Reagent 1 (Assay Buffer): 50 mLx1
- Reagent 2 (Renkli ABTS radikal solüsyonu): 10 mLx1
- Standart 1 (Kör çözelti)
- Standart 2 (1.0 mmol Trolox equivalent/L solüsyon): 10 mLx1

İlk olarak örnek tüplerine 500 µL Reagent 1 ve 30 µL örnek eklendi. Daha sonra boş bir tüpe 500 µL Reagent 1 ve 30 µL deiyonize su eklenerek standart 1 tüpü hazırlandı. Aynı

şekilde 500 µL Reagent 1'in üzerine 30 µL deiyonize su eklenerek standart 2 tüpü elde edildi. 660 nm'de ilk spektrofotometrik okumalar yapıldıktan sonra tüm örneklerin üzerine 75 µL Reagent 2 ilave edildi. 5 dakika, 37 °C 'de bekletildikten sonra ikinci absorbans değerleri ölçüldü. Sonuç aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{Total Antioksidan Seviye} = \frac{[(\Delta\text{Abs. standart1}) - (\Delta\text{Abs. örnek})]}{[(\Delta\text{Abs. standart1}) - (\Delta\text{Abs. standart2})]}$$

Δ: Abs.2-Abs.1

3.2.4.3. İstatistikler Analizler

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS Version 18 (SPSS Inc. Chicago USA) for Windows paket programı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), LSD testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Total Oksidan ve Antioksidan Seviye (TOS ve TAS)

Silybum marianum'dan elde edilmiş Silibinin ve *Viscum album L.*'den elde edilmiş Helixor'un total oksidan ve total antioksidan seviyeleri araştırılmıştır. OSI değeri düşük olan etken maddenin antioksidan özelliği yüksektir. Çalışmamızda antioksidan özelliği en yüksek olan değer S-10 µg/L olan konsantrasyonda bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Silibinin ve Helixor' un total antioksidan, oksidan seviyeleri ve oksidatif stres indeksi değerleri

	TAS	TOS	OSI
S-1 µg/L	0.99	20	2020
S-10 µg/L	1.28	14.6	1140
H-1 µg/L	0.48	32	6666
H-10 µg/L	0.61	30	5018

S: Silibinin, H: Helixor, TAS: Total antioksidan seviye, TOS: Total oksidan seviye, OSI: Oksidatif stres indeksi

4.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Silibinin'in H₂O₂ ile Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu Özelliğine ve Tamir İndüksiyonuna İlişkin Bulgular

Silmarin'in 1 µg/mL ve 10 µg/mL' lik konsantrasyonlarının 5 mM H₂O₂ ile maya hücrelerinde oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. *S. cerevisiae* sferoplastları Silmarin'in 1 µg/mL ve 10 µg/mL' lik konsantrasyonlarında 30 dk ön inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 5 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda en yüksek DNA skor ortalaması PK grubunda 169,66±14.64 olarak bulunmuştur. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur (p<0,05). En düşük DNA hasar skor ortalaması NK 101.0 ± 6.24 olarak elde edilmiştir. Etken madde ile ön inkübasyona bırakılan gruplarda S-1+H₂O₂ ve S-10+H₂O₂ için sırasıyla DNA hasar ortalamaları 151,66±15,01 ve 134,33±13,31 bulunmuştur. PK grubu ile karşılaştırıldığında 1 µg/mL'lik etken madde uygulamasında meydana gelen DNA hasarındaki azalış istatistiksel olarak önemlidir.(p< 0.05). 10 µg/mL' lik etken madde uygulaması

sonrasında DNA hasarında meydana gelen düşüş istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.2.1).

Silmarin'in 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarının 5 mM H_2O_2 ile indüklenmiş maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı tamir edici etkisi araştırılmıştır. *S. cerevisiae* sferoplastları 5 mM H_2O_2 ile oluşturulan hasar sonrasında da 1 mg/mL ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonlarda 30 dk inkübasyona bırakıldı. En yüksek DNA skor ortalaması PK grubunda olarak $169,66 \pm 14,64$ bulundu. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). En düşük DNA hasar skor ortalaması hiçbir muamele görmemiş K grubunda $101,0 \pm 6,24$ olarak bulundu. Etken madde ile inkübasyona bırakılan gruplarda DNA hasar skor ortalaması $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-1}$ ve $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-10}$ için sırasıyla $160,33 \pm 7,57$ ve $143,66 \pm 8,08$ olarak bulunmuştur. Pozitif kontroldeki hasar yaklaşık $169,66 \pm 14,64$ olarak bulunmuştur. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). PK grubu ile karşılaştırıldığında etken maddenin 1 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulama sonrasında DNA hasarındaki azalış istatistiksel olarak önemli değildir ($p > 0,05$), 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik uygulama sonrasında DNA hasarındaki azalış istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.2.1).

Çizelge 4.2.1 Silibinin'in H_2O_2 ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı koruyucu ve tamir edici durumu

	N	Ortalama \pm SD	NK	PK	DMSO	S-1+ H_2O_2	S-10+ H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-1}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-10}$
NK	3	$101,0 \pm 6,24$	-	1	0	1	1	1	1
PK	3	$169,66 \pm 14,64$	1	-	1	0	1	0	1
DMSO	3	$110 \pm 7,21$	0	1	-	1	0	1	1
S-1+ H_2O_2	3	$151,66 \pm 15,01$	1	1	0	-	0	0	0
S-10+ H_2O_2	3	$134,33 \pm 13,31$	1	1	1	0	-	1	0
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-1}$	3	$160,33 \pm 7,57$	1	0	1	0	1	-	0
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{S-10}$	3	$143,66 \pm 8,08$	1	1	1	0	0	0	-

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, S: Silibinin, S-1: Silibinin 1 $\mu\text{g/mL}$, S-10: Silibinin 10 $\mu\text{g/mL}$, N: Tekrar sayısı, SD: Standart sapma
1: Farklı ($p < 0,05$) 0: Benzer ($p > 0,05$)

4.3. Farklı Konsantrasyonlardaki Helixor'un H₂O₂ ile Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu Özelliğine ve Tamir İndüksiyonuna İlişkin Bulgular

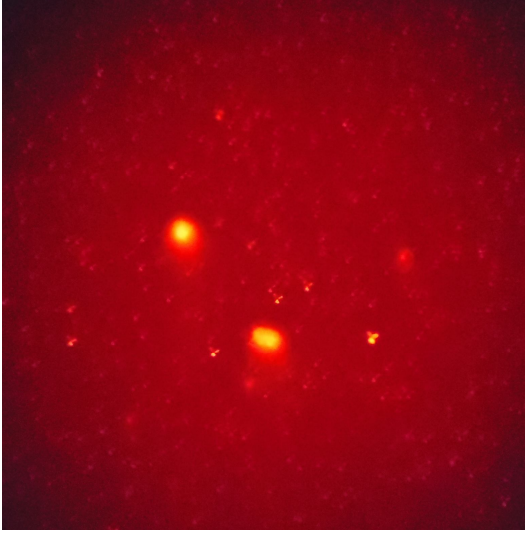
Helixor'un 1 µg/mL ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 5 mM H₂O₂ ile maya hücrelerinde oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. *S. cerevisiae* sferoplastları Helixor'un 1 µg/mL ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarında 30 dk ön inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 5 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda en yüksek DNA skor ortalaması PK grubunda 169,66±14.64 olarak bulunmuştur. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur (p<0,05). En düşük DNA hasar skor ortalaması NK 101.0 ± 6.24 olarak elde edilmiştir. Etken madde ile ön inkübasyona bırakılan gruplarda H-1+H₂O₂ ve H-10+H₂O₂ için sırasıyla DNA hasar ortalamaları 166.33±4.04 ve 151.0±8.18 olarak bulunmuştur. PK grubu ile karşılaştırıldığında 1 µg/mL'lik etken madde uygulamasında meydana gelen DNA hasarındaki azalış istatistiksel olarak önemli değildir (p > 0.05). 10 µg/mL' lik etken madde uygulaması sonrasında DNA hasarında meydana gelen düşüş istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05) (Çizelge 4.3.1).

Helixor'un 1 µg/mL ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarının 5 mM H₂O₂ ile indüklenmiş maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı tamir edici etkisi araştırılmıştır. *S. cerevisiae* sferoplastları 5 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasar sonrasında da 1 µg/mL ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarda 30 dk inkübasyona bırakıldı. En yüksek DNA skor ortalaması PK grubunda olarak 169.66±14.64 bulundu. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur (p<0,05). En düşük DNA hasar skor ortalaması hiçbir muamele görmemiş K grubunda 101.0 ± 6.24 olarak bulundu. Etken madde ile inkübasyona bırakılan gruplarda DNA hasar skor ortalaması H₂O₂+ H-1 ve H₂O₂+ H-10 için sırasıyla 167.0±9.16 ve 158.33±7.50 olarak elde edilmiştir. Pozitif kontroldeki hasar yaklaşık 169,66±14.64 olarak bulunmuştur. Bu değer denenen tüm diğer uygulamalarda farklı bulunmuştur (p<0,05). PK grubu ile karşılaştırıldığında etken maddenin 1 µg/mL ve 10 µg/mL'lik uygulama sonrasında DNA hasarındaki azalış istatistiksel olarak önemli değildir (p > 0,05) (Çizelge 4.3.1).

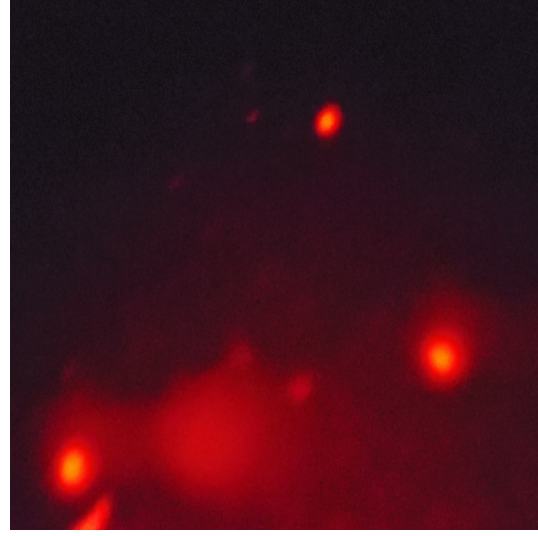
Çizelge 4.3.1 Helixor' un H₂O₂ ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı koruyucu ve tamir edici durum

	N	Ortalama ± SD	NK	PK	DMSO	H-1+H ₂ O ₂	H-10+H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + H-1	H ₂ O ₂ + H-10
NK	3	101.0 ± 6.24	-	1	0	1	1	1	1
PK	3	169.66±14.64	1	-	1	0	1	0	0
DMSO	3	110±7.21	0	1	-	1	1	1	1
H-1+H ₂ O ₂	3	166.33±4.04	1	0	1	-	1	0	0
H-10+H ₂ O ₂	3	151±8.18	1	1	1	1	-	1	0
H ₂ O ₂ +H-1	3	167±9.16	1	0	1	0	1	-	0
H ₂ O ₂ +H-10	3	158.33±7.5	1	0	1	0	0	0	-

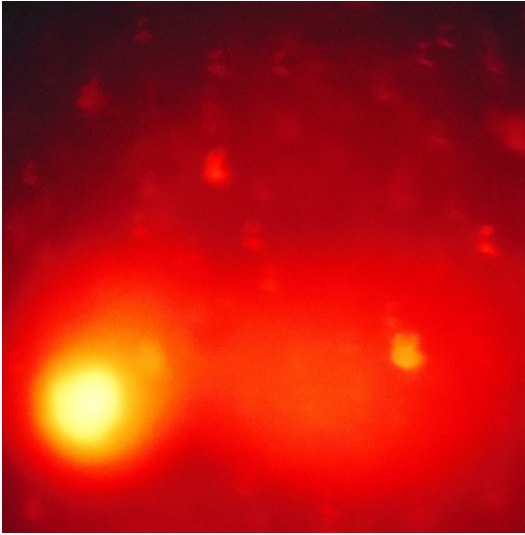
NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, H: Helixor, H-1: Helixor 1 µg/ml, H-10: Helixor 10 µg/ml, N: Tekrar sayısı, SD: Standart sapma
1: Farklı (p < 0.05)
0: Benzer (p > 0.05)



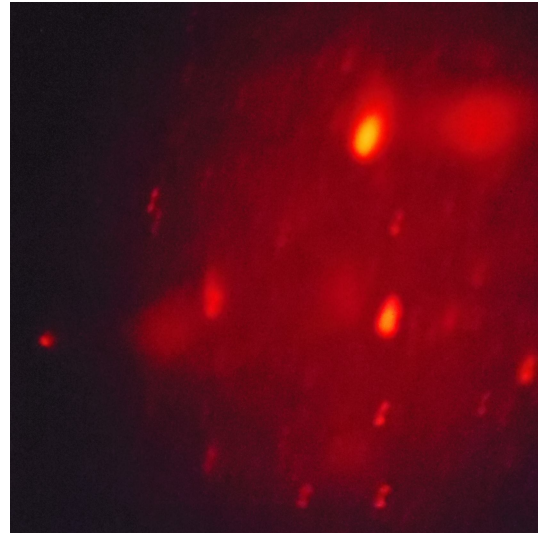
0. Dereceden Hasarlı Maya Hücreleri



1. Dereceden Hasarlı Maya Hücreleri



2. Dereceden Hasarlı Maya Hücreleri



3.ve 4. Dereceden Hasarlı Maya Hücreleri

Resim 4.1 Etidyum Bromid ile Boyanmış Maya DNA'larının floresan mikroskop görüntüsü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada, iki farklı konsantrasyonda Silibinin' in ve Helixor'un, *S. cerevisiae*'de H₂O₂' nin oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu ve tamir indüksiyon etkinliği araştırıldı. Hücrelerde ve DNA' da hasar oluşturmak üzere pozitif kontrol olarak H₂O₂ ve etken madde uygulamalarında çözücü kontrol olarak da DMSO kullanıldı.

DNA'da ortaya çıkan hasar seviyesi, ucuz ve hassas bir yöntem olması sebebiyle alkali tek hücre elektroforez yöntemi (Comet Assay) ile belirlendi. DNA skor ortalaması LSD testi ile tayin edildi.

DNA koruyucu etkinlikte ise *S. cerevisiae* sferoplastlarına önce farklı konsantrasyonlardaki Silibinin ve Helixor ayrı ayrı uygulandı. Sonrasında 5 mM H₂O₂ ilave edildi. Sonuç olarak H₂O₂'nin DNA üzerinde hasar meydana getirme etkisine karşı Silibinin ve Helixor'un belli dozlarda oldukça yüksek bir savunma hattı oluşturarak, DNA hasarını önemli ancak farklı oranlarda azalttığı gözlemlendi.

DNA hasar tamir etkinliğinde *S. cerevisiae* sferoplastlarına önce 5 mM H₂O₂ aracılığı ile hasar verildi. Daha sonrasında etken maddeler uygulanmak suretiyle, H₂O₂ ile meydana getirilen hasarı tamir etmede 1 µg/mL'lık Silibinin ve Helixor'un yeterli olmadığı görüldü. Her iki etken madde de 10 µg/mL olarak kullanıldığında ise istatistiksel olarak önemli sonuçlar elde edildi. Yapılan bu çalışma fitoterapide yaygın olarak kullanılan Silmarin ve Helixor'un, *S. cerevisiae* hücrelerinde meydana gelebilecek DNA hasarını tamir etkinliğini ortaya çıkarması bakımından oldukça büyük önem taşır.

H₂O₂ kullanılarak oluşturulan DNA hasarına karşı Helixor'un herhangi bir tamir indüksiyon etkinliği görülmemiştir. Silmarin'in tamir indüksiyon etkinliğinde ise 10 µg/mL konsantrasyonunda, DNA hasarında azalma meydana getirdiği bulundu. Silmarin'in 1 µg/mL'lık konsantrasyonunda ise herhangi bir tamir etkinliği görülmedi. Kullanılan iki etken madde karşılaştırıldığında ise Silibinin'in Helixor'a oranla tamir etkisinin daha yüksek olduğu görüldü.

Silibinin'in en iyi koruyuculuk dozu olarak $134,33 \pm 13,31$ hasar skoru ile $10 \mu\text{g/mL}$ 'lık konsantrasyonu belirlenmiştir. Helixor'un en iyi koruyuculuk dozu olarak ise $151,0 \pm 8,18$ hasar skoru ile yine $10 \mu\text{g/mL}$ 'lık konsantrasyonu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan iki etken madde karşılaştırıldığında ise Silibinin'in DNA'yı hasardan koruma etkinliğinin Helixor'dan daha fazla olduğu bulundu.

Yapılan çalışmalar silmarinin lenfositlerde glütation, glütation peroksidaz, superoksit dismutaz seviyelerini düzenlediğini göstermiştir (Wellington and Jarvis 2001). Bu enzim sistemleri, oksidatif strese karşı koruma, gen ekspresyonunu düzenleme, apoptasi başlatma, lenfositlerin aktivasyonu ve çoğalmasını da içeren çeşitli önemli fonksiyonlara sahiptirler (Alidoost *et al.* 2006). Silibinin ve quersetinin de dahil olduğu bazı antioksidanlar, hücre ve dokuları reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan etkilere karşı koruyabilmektedir. Bu maddelerin antioksidan özelliği serbest radikallerin salınımından, demir ya da bakır iyonlarının şelatlaşmasından ve oksidaz inhibisyonundan kaynaklanır (De Groot and Raven 1998). *Silybum marianum*' dan elde edilen antioksidanlar karaciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar ortaya koymuştur ki, sadece bütün karaciğer hücrelerin de ya da geri dönüşümsüz düzeyde hasarlı karaciğer hücrelerinde pozitif etkili olmayıp aynı zamanda kısmi karaciğer rezeksiyonundan sonra karaciğerin tekrar yenilenme kapasitesini de uyarmaktadır (Schriewer and Weinhold 1973).

Kızıl *et al.* (2009) *Hypericum scabroides* (HS) ve *Hypericum triquetrifolium* (HT) bitkilerinin etanol ekstraktlarının DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisini DNA Agaroz Jel Elektforezi yöntemiyle incelemişlerdir. HS ve HT bitkilerinin etanol ekstraktlarının hidroksil radikalleri sonucu oluşan net DNA kesimini önleme yüzdelerini, $400 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sırasıyla $\% 97,00 \pm 2,6$ ve $\% 95,61 \pm 2,6$ olarak bildirmişlerdir. Konsantrasyonlar ve yüzdeler arasındaki farklılıklar dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının hidroksil radikalleri sonucu oluşan DNA kesimini önleme aktivitesinin HT ve HS bitkilerinin etanol ekstraktlarına göre daha düşük olduğu sonucuna varıldı.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktivite testlerinde, pozitif kontrollerle kıyaslanabilecek derecede antioksidant aktivite gösterdiği ve serbest radikal söndürücü özelliğinin olduğu bildirildi. Tohum ekstraktının Bovine Serum Albumin (BSA) oksidasyonunu (50-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında) önlediği tespit edilmiştir. Ayrıca ekstraktın DNA oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar deve diken bitki materyalinin özellikle tohumunun, farklı hastalıklar için antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Serçe 2012).

Avrupa da yetişen ökse otu sulu preparatları tüm bitki kullanılarak elde edilmiştir. Sitotoksik ve bağışıklık sistemini düzenleyici özellikleri vardır ve Almanya ve Orta Avrupa da alışılmadık bir şekilde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.(Grossarth *et al.* 2001, Mansky *et al.*2003). Almanya da ökse otu ekstratı, kanser tedavi ilacı olarak ticari olarak kaydedilmiştir (Happly 2000).

Uluslararası tıbbi yayınlarda ökseotu, kanser ve AIDS gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Burçoğlu 1997). Ökseotundan elde edilen Iscador ilacının, Almanya'da HIV'e yakalanan 40 kişi üzerinde yapılan doz denemelerinde, hem anti-HIV ve hem de bağışıklık düzenleyici etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Gorter 1993).

Farmakolojik özellikleri bilinen *Viscum album* L.'un çeşitli ekstraktlarının vazodilatör, sedatif, diüretik etkileri mevcuttur. Bunlara ek olarak şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, sinir bozukluğu, damar tıkanıklığı, romatizma ağrıları, çıban ve eklem iltihabı gibi bir takım iltihabi hastalıkların yanı sıra kanser terapilerine yardımcı olarak da kullanılmaktadır (Bussing *et al.* 1994, Paralı 1994, Meschini *et al.* 1996). Bu sebeple *Viscum album* L.'un bazı kanser vakalarının erken teşhisinde ve evre tespitinde destekleyici faktör olarak düşünülen ve sıkça kullanılan sitogenetik yöntemlerden biri olan KKD üzerine etkisinin araştırıldığı bir takım çalışmalar yapılmıştır (Bussing *et al.* 1994, Bussing *et al.* 1998). Bu konuda yapılan çalışmada, periferal kan mononuklear

hücrelerindeki KKD sıklığının, artan konsantrasyonlar şeklinde uygulanan *Viscum album* L. ekstraktı ile düştüğü gözlenmiştir.

Bussing ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Viscum album* L.'un hızlı çoğalan amniyon sıvısında KKD sıklığı ve proliferasyon indeksini gözlemlemişlerdir. 10 kadından alınan amniyon sıvısında, *Viscum album* L.'un sulu çözeltisi (IscodorR P) tedavi edici konsantrasyonda eklendiğinde KKD sıklığında bir değişim olmamış fakat yüksek dozlarda verildiğinde önemli bir düşme görülmüştür. Proliferasyon indeksinin sabit değerde kaldığı, yüksek dozlarda bile poliferasyonun düşmediği gözlenmiştir (Bussing *et al.*1995).

Çalışmada Silibinin ve Helixor'un, güçlü bir mutagen olan H₂O₂'in DNA hasarı oluşturucu etkisine karşı önemli derecede koruyucu özelliğe sahip olduğu ancak oluşan hasarı tamir etmede Helixor'un Silibinin'e göre yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, çalışmada kullanılan etken maddelerin hasar oluşumundan önce ve koruyucu olarak optimum dozda alınması gerektiği gösterilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Acartürk R. (1996). Şifalı Bitkiler, *Flora ve Sağlığımız*. Karşıyaka, İzmir.
- Akuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, *Sağlık Dizisi*, 5, ISBN:975-543-038-5, Konya.
- Alidoost F., Gharagozloo M., Bagherpour B (2006). Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from beta-thalassemia major patients. *Int Immunopharmacol* **16**: 1305-1310.
- Altuntaş, İ. (2007). Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Amundson A., Patterson A., Dokt, Fornace AJ Jr.(2002). A nucleotide excision repair masterwitch: p53 regulated coordinate in duction of global genomic repair genes, *Cancer Biol Ther*. Mar-Apr;1 **2**: 145-9
- Anon. Drog Ticareti (1998). Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Arş. Mer., Tıbbi ve Aromatik Bitkiler (TAB);13–14.
- Ateş I., Suzen, HS., Aydın, A. ve Karakaya, A. (2004). The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injection. *Biometals*, 17 **4**: 371-7.
- Barrite, D., Jacobson, I., M., Esposito, S., Russo, M.W. (2002). The effects of MilkThistle (Silimarin) on serum alanine aminotransferaz C and viral levels in patients with chronic hepatitis C. *The American J. of Gastroenter*. **96**: 117.
- Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G.(1990). Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybinphosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *European J. of Drug Metab*. **15**: 333-338.

- Baytop T.(1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. 40, İstanbul: Sanal Matbacılık, 203-4.
- Becker H.(1986). Botany of European mistletoe (*Viscum album* L). *Oncology* 43 **1**: 2-7.
- Bergner, P.(1988). Botanical medicine: *Silybum marianum* and liver therapy. *Townsend Letter Doctors* **61-2**: 348-9.
- Blumenthal, M. (2000). Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs. *Integrative Med. Comm.* 257-263.
- Bohr, VA. (1995). DNA repair fine structure and its relations to geno-mic instability. *Carcinogenesis*, **16**: 2885-92
- Boiteux, S. and Guillet, M. (2004). *Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in Saccharomyces cerevisiae*. DNA Repair (Amst), 3 **1**: p. 1-12.
- Bozkurt H. (2004). Bazı Cisplatin Türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Braña, M., Cacho, M., Gradillas, A., de Pascual-Teresa, B. and Ramos, A. (2001). Intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 7 **17**: 1745 80
- Brown, D.J. (1996). Herbal Prescriptions For Better Health, Prima Publishing, S:151.
- Burçak, G. and Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med*, 35 **4**: 159-169.
- Burçoğlu, A., (1997). Ökseotu AIDS Tedavisinde Yeni Bir Umut. *Popüler Bilim Dergisi*, Temmuz Sayısı.

- Burtis, C.A. and Ashwood, ER. (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
- Bussing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A., Schweizer, K. (1994); Viscum album L extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Cancer* 30A **12**: 1836-1841.
- Bussing A, Lehnert A., Schink M., Mertens R., Schwizer K. (1995). Effect of Viscum album L. on rapidly proliferating amniotic fluid cells. *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research* **45**: 81-83.
- Bussing, A., Multani AS., Pathak, S., Pfüller, U., Schietzel, M.(1998). Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from Viscum album L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Letters* **130**: 57-68.
- Caoraso, N. (2003). The Molecular Epidemiology of Oxidative Damage to DNA Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*; 95 **17**: 1263-1265
- Cooper, MR. And Johanson, AW. (1984). Poisonous plants in Britain and their effects on animals and man. E. & S. Livingstone Ltd. Londra.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C. (2003). Screening Of Some Grek. Aromatic Plants For Antioxidant Activity. *Phytotherapy Research*. **17**: 194-195.
- Craig, WJ. (1999). Health-promoting properties of common herbs 1,2 (Suppl). *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 **3**: 491-499.
- Çubukçu, B., Sarıtaş, G., Meriçli, AH., Süylüpinar, N., Mat, A., Meriçli, F. (2002). Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Farmakognози Anabilim Dalı, İstanbul,1-3.

- De Groot, H., Raven U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*; **12**: 249-55
- Dehmlow, C., Erhard, J., Degroot, H. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for hepatoprotective properties of silibinin. *Hepat.* 749-755.
- Delebeç, B.B. and Kantarcı, G. (2006) Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kansere İlişkisi. *J Fac Pharm*, 35 **2**: 149-70
- Denir, S.(2005). Farklı *Salvia Tomentosa* Ekstaktlarının C6 Glioma Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürü Modelinde Antitümör Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. ve Yiğit, F. (2009). A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8 **14**: 3118-3127
- Dillar, C.J. and German, J.B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci Food Agric.*, **80**: 1744-1756.
- Diploc, A. (1998) . Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.
- Dizdaroğlu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free radical Biology & Medicine*, **10**: 225-242
- Dündaroz, M.R., Türkbay, T., Akay, C., Sarıcı, S.U., Aaydın, A., Denli, M., Gökçay, E. (2003). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. *Turk J. Pediatr.*, **45**: 43-5.
- Eliot, J.G. (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53 **2**: 46-48

- Elmastaş, M. , Gülçin, İ. , Işıldak, Ö. , Küfrevioğlu, Öİ. , İbaoğlu, K. , Aboul- Enein, HY. (2006a.). Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *J Iran Chem Soc*, **3**: 258–266.
- Ergun, F., Deliorman, D., Şener, B. (1994). *Viscum album* L. (Ökse otu) (Loranthaceae) bitkisinin morfolojik özellikleri ve Türkiye’deki yayılışı hakkında bazı araştırmalar. *OT Sistematik Botanik Dergisi*; 1 **2**: 47-61.
- Ergun, F., Deliorman, D. (1995) *Viscum album* L. (Ökse otu) bitkisinin kimyasal bileşimi. *Ankara Ecz. Fak. Dergisi*; 24 **2**: 95-107.
- Fairbain, D.W., Olive, P.L. and O’Neill, K.L. (1995). The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutation Res.* **339**: 37-59
- Floy, R.A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**: 9, 1447-1450.
- Foster, S. (1990). Milk thistle: *Silybum marianum*. Austin (TX): *American Botanical Council*.
- Fraga, CG., Shinenaga, MK., Park, JW., Degan, P. And Ames, BN. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2’-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 **12**: 4533-7.8
- French SW. (2004).The role of hypoxia in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research*; **29**: 69–74.
- Ferguson, L. and Denny, W. (1991). The genetic toxicology of acridines. *Mutat Res* 258 **2**: 123-60
- Frantz, M., Jung, ML., RibereauI-Gayon, G., Anton, R.(2000). Modulation of mistletoe

(*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* ; 50 **5**: 471-8.

Friedberg, E.C.(2003). *DNA damage and repair*. Nature. 421 **6921**: p. 436-40

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio,G., Cox, LS., Lane, DP., Abbondandolo, A. and Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *J Biol Chem*. Apr 19, 271 **16**: 9573-8.

Gabius, HJ., Gabius, S., Joshi, SS., et al.(1994) From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: will there be a reason for oncological application of mistletoe? *Planta Med* ; 60 **1**: 2-7.

Geoffrey, M., Cooper, Robert E. Hausman (2006). Hücre Moleküler Yaklaşım. Türkçe çeviri. 3. Baskı. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, p.192-230.

Gichner, T., Patkova, Z., SzakovaZakova, J., Znidar, I. And Mukherjee, A.(2008b). DNA damage in potato plants induced by cadmium ethyl methanesulfonate and γ -rays. *Environmental and Experimental Botany*, **62**: 113-119

Gichner, T., Znidar, I. Wagner, E.D. and Plewa, M.J. (2009). The use of higher plants in the comet assay. In: *The Comet Assay in Toxicology* Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. *Royal Society of Chemistry*, p: 98-119

Gorter, R. (1993). Immune Modulating And Anti-Hiv Activities Of *Viscum album* (Iscador), *IX International Conference On Aids, June 1993*, Po-B28-2167, Berlin.

Griffiths, A., Wessler, S., Lewontin, R., Gelbart, W., Suzuki, D. and Miller, J. (2005). *Introduction to Genetic Analysis*. 8th Edition Chapter **14**: Mutation, W.H.Freeman & Company.

- Grossarth-Maticek R., Kiene, H., Baumgartner, SM., Ziegler, R. (2001). Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. *Altern Ther Health Med*; **7**: 57-66, 68-72
- Gunaratne, C., Zhang, T. (2003). Application of liquid chromatography-electrospray ionizations trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibinin in human liver microsomes. *J.of Chromatog.* **794**: 303-310.
- Guo, Y., Breeden, L. L., Zarbl, H., Preston, B. D. and Eaton, D. L.(2005). *Expression of a human cytochrome p450 in yeast permits analysis of pathways for response to and repair of aflatoxin-induced DNA damage.* *Mol Cell Biol* 25 **14**: p. 5823-33.
- Gülbahar, Ö. (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 10 **1**: 43-48.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: a structureactivity insight. *Innov Food Sci Emerg*, **11**: 210–218.
- Haber, F. and Weiss, J.J. (1984). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser* 147, 332-351
- Haber, JE. (1999). DNA Recombination: the replication connection, *TIBS*, July: **24**: 271-275
- Haber, JE. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet. Jun*, 16 **6**: 259-64, Review.
- Halliwell, B. , Guttridge, JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.

- Halliwell, B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?. *Am J Clin Nutr*, 72 **5**: 1082-7.
- Halliwell, B. (2002). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *American Society of Plant Biologists*, **141**: 312-322
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(2005). Free radicals in biology and medicine. *3.ed. Oxford Science Publications Pres Inc.*, London.
- Happle, R. (2000) Alternative medicine: really an alternative to academic medicine *Hautarzt* **51**: 439-43.
- Horoz, M., Bolukbaş, C., F., Koçyiğit, A., Aslan, M., Koylu, A.O., Gümüş, M., Çelik, H. and Koksal, M. (2006). Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subject with hepatitis C infection *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596 **1-2**:137-142
- Jane, M., Murphy, RNC, MS, PNP, Marry Caban, BS, MPH and Kathi J. Kemper, MD, MPH.(2000). Milk Thistle Longwood Herbal Task Force
- Jeffrey, A. (1985). DNA modification by chemical carcinogens. *Pharmacol Ther.*, 28 **2**: 237-72
- Kılınç, K.ve Kılınç, A. (2002). Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33 **2**: 110–118.
- Kızıl, G., Kızıl, M. , and Çeken, B. (2009). Protective Ability of Ethanol Extracts of *Hypericum scabroides* Robson & Poulter and *Hypericum triquetrifolium* Turra against Protein Oxidation and DNA Damage. *Food Sci. Biotechnol*, **18**: 130-136.

- Koçyiğit, A., Keleş, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. and Erel, O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res.*, 585 **1-2**: 71-8
- Krıkan, H.E., Standal R., and G. Slupphaug, *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. Biochem J*, 1997. **325 (Pt 1)**: p. 1-16.
- Kulaksız, G. ve Sancar, A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, 32, **3**: 104-11.
- Li S.(2002). Mistletoe lectins: telomerase inhibitors in alternative cancer therapy. *Drug Discovary Today*. 7 **17**: 896-897.
- Lin, A., Zhang , X., Chen, M. and Cao, Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, **19**: 596-602.
- Liu, RH. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *American Society for Clinical Nutrition*. **78**: 517-520
- Luther, P., Becker, H.(1987). Die Mistel, Springer-Verlag, Berlin.
- Mandacı S. (1998). Balıkesir İli Tarım ve Orman Alanlarında Ökse Otları, Zararları, Koruma ve Savaşma Yöntemleri. Uludağ Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
- Mansky, PJ., Grem J, Wallerstedt DB, Monahan, BP., Blackman, MR.(2003). Mistletoe and gemcitabine in patients with advanced cancer: a model for the phase I study of botanicals and botanical-drug interactions in cancer therapy. *Integr Cancer Ther*; **2**: 345-52.

- Marques, F.(2009). Evaluation of prevention of DNA damage and induction of DNA repair by natural compounds, Minho University, M.Sc Thesis: 27p.
- Mathers, J., Jennifer, A., Fraser, M., McMahon, Robert, D.C. Saunders, John D.Hayes and Lesley I.McLellan, (2004). *Antioxidant and cytoprotective responses to redox stres*, **71**: 157-176
- Meriçli, AH.(1984). Türkiye'nin değişik bilgelerinde yetişen silybum marianum türlerinin meyvelerinin flavonolignan bileşikleri yönünden incelenmesi. *Doğa Bilim Der.*; 8 **2**: 203.
- Meschini, R., Bstinelli, R., Palitti, F.(1996). The diplochromosome of endoreduplicated cells: a new approach to higligh the mechanism of sister chromatid exchange. *Chromosoma*; **105**: 50-54.
- Milgrom, E., Diab, H., Middleton, F. and Kane, P. M.,(2007). *Loss of vacuolar protontranslocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stress. J Biol Chem.*, 282 **10**: p. 7125-36.
- Miller, AG.(1982) *Viscum album L. in 'Flora of Turkey and the East Aegean Islands'*. 7, Davis: P.H. Ed.
- Nakamura, J. and Swenberg, J.A. (1999). *Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. Cancer Res.* 59 **11**: p. 2522-6.
- Nash, H.M., Bruner, S. D., Scharer, O. D., Kawate, T., Addona, T. A., Spooner, E., Lane, W. S. and Verdine, G. L. (1996). *Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. Curr Biol.* 6 **8**: p. 968-80.
- Nawar, W.W. (1996). Lipids. In Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.

- Norbury, C.J. and Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**: 367-401
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50 **11**: 3122-3128.
- Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit F.(2009). DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg*; 7 **2**: 61-70
- Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **123**: 291-298
- Pada., (1995). (Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods). *J. Am. Diet. Assoc.*, **95**: 493-496.
- Prali, F. (1994). Ethidium bromid (EtBr) in vitro İnsan Lenfositlerine Ekisinin SCE Yöntemi ile Gösterilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Paris R.R. and Moysa M.H. (1981). *Precis de Matière medicale*, Tome II, Second ed., 108, Paris; Masson Publishing.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, **63**: 1035–1042.
- Rank, J., Syberg, K. and Jensen, K. (2009). Comet assay on tetraploid yeast cells. *Mutation Research* **673**: 53-58
- Rote L. (1994). *Editio Cantor*, Aulendorflwürtt.

- Sanchez-Sampedro, MA., Pelaez, R., Corchete, P. (2008). An Arabinogalactan Protein Isolated from Medium of Cell Suspensions Cultures of *Silybum marianum* Gaernt. *Carbohydrate Polymers*. **71**: 634-638.
- Saller, R.(2001).The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **61**: 2035-63.
- Salmon, T.B., Evert, B. A., Song, B. and Doetsch, P. W.(2004). *Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 32 **12**: p. 3712-23.
- Schofield M.J. and Hsieh, P. (2003). DNA mismatchrepair: molecular mechanisms and biological function, *Annu. Rev. Microbiol*; **57**: 579-608
- Schriewer, H. and Weinhold, F. (1973). The influence of silybin from *Silybum marianum* (L.) gaertn. on in vitro phosphatidyl choline biosynthesis in rat livers *Arzneimittelforschung*; **29**: 791-2
- Serafini, M. and Del Rio D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report*. 9 **3**: 145-152
- Serçe, A.(2012). Meryem Ana Dikeni (*Silybum marianum* L. Gaertner) Tohumunun Antioksidan Aktivitesi, Oksidatif DNA Hasarı ve Protein Oksidasyonu Önleyici Etkisinin Araştırılması. Dicle Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, **91**: 31–39.
- Silva, C.G., Herdeiro, R. S., Mathias, C. J., Panek, A. D., Silveria, C. S., Rodrigues, V. P., Renno, M. N., Falcao, D. Q., Cerqueira, D. M., Minto, A. B., Nogueira, F. L.,

Quaresma, C. H., Silva, J. F., Menezes, F. S. and Eleutherio, E. C. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol Res*, 52 **3**: p. 229-33.

Simanek, V., Kren, V., Ulrichova, J., Vicar, J., Cvak, L. (2000). Silymarin: What is in the name? *Hepatology*, **32**: 442–443.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**: 184-91

Singh, N.P., Danner, D.E. Tice, R.R., Brant, L. and Schneider, E.L. (1990). Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology. *Mutat. Res.* 37 P:123.

Singh, N.P., Mallikarjuna, GU., Sharma, G., et al. (2004). Oralsilibinin lung tumorgrowth in athymic nudemice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor nB-mediated inducible chemoresistance. *Clin Cancer Res.* **10**: 8641-7.

Singh, R.P, Dhanalaksimi, A., Agarwal, C., Agarwal, R. (2005). Silibinin strongly inhibits growth and survival of human endothelial cells via cell cycle arrest and downregulation of survivin, Akt and NF-[kappa]B: implications for angioprevention and antiangiogenic therapy. *Oncogene* 24 **7**: 1188-1202.

Sioamak, A., Tujakowski, J., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., Dziaman, T., Roszkowski, K. and Olinski, R. (2006). Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. *Int J Cancer*, 119 **9**: 2228-30.

Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, HE. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of axidative DNA damage. *Mutat Res*, **531**: 231-51

- Stojic, L., Brun, R., Jiricny, J. (2004). Mismatchrepair and DNA damage signaling, DNA Repair (Amst), *Aug-Sep*; 3 **8-9**: 1091-101
- Tanker, M. ve Tanker, N. (2003); Farmakognozi. Cilt I. *Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları* No:58, Ankara, 213-214.
- Tanker, N., Koyuncu, M., and Coşkun, M. (2004). Farmasotik Botanik. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*. No: 88 s: 281,324,325.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Mutation Research*; **35**: 206-21
- Tietz, NW. (1995). Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Tosetti, F., Noonan, D.M and Albin, A. (2009). Metabolic regulation and redox activity as mechanisms for angioprevention by dietary phytochemicals. *Int J Cancer*,. 125 **9**: p. 1997-2003.
- Tu, Y., Tornaletti, S.and Pfeifer, GP. (1996). DNA repair domains within a human gene: Selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J*; **15**: 675-83
- Vogel, G. (1980). The anti-amanita effect of silymarin.In: Faulstich H. Amanita toxins and poisoning. Baden- Baden: Verlag Gerhad Witzstrock, 180-7.
- Wellington K, Jarvis B.(2001). Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Bio Drugs* **15**: 465-489,.

- Williams, GM. and Jeffrey, AM. (2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol*, 32 **3**: 283-92
- William, S., Klug and Michael R. Cummings. (2002). Genetik Kavramlar. Altıncı Baskıdan Türkçe Çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara, 477-481.
- Zhang, Y., Rohde, LH., and Wu, H. (2009). Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms Current Genomics, Vol. 10, No. 4.
- Zheng, W. and S.Y. Wang, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*, 2001. 49 **11**: p. 5165-70.
- Zhou, K. , Auxl, JJ. , Yu, L.(2004). Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* , **52**: 1118–1123.
- Zielinska-Przyjemska, M., and Wiktorowicz, K.(2006). An in vitro study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. *Phytother Res.* 20 **2**:115-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Füsun KILÇIK
Doğum Yeri ve Tarihi : Bolvadin, 05.05.1980
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0532 382 09 02, fusun03@hotmail.com
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Süper Lise (1994-1998)
Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü (1998-2002)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2011-2013)