

***Nigella sativa* SULU EKSTRESİNİN
OKSİDATİF DNA HASARINA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şöhret YÜKSEK

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2011

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Nigella sativa* SULU EKSTRESİNİN
OKSİDATİF DNA HASARINA ETKİLERİ**

Şöhret YÜKSEK

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2011

TEZ ONAY SAYFASI

Şöhret YÜKSEK tarafından hazırlanan “*Nigella sativa* Sulu Ekstresinin Oksidatif DNA Hasarına Etkileri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 22/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Başkan : Prof. Dr. Muhsin KONUK
AKÜ Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
AKÜ Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ENGİNAR
AKÜ Fen Edebiyat Fakültesi

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

.....
Enstitü Müdürü
(Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN)

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

Nigella sativa SULU EKSTRESİNİN OKSİDATİF DNA HASARINA ETKİLERİ

Şöhret YÜKSEK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Çörek Otu (ÇO) (*Nigella sativa*)'nun antibakteriyel, antikanserojenik, antiinflamatuvar ve antioksidan aktivite gibi insan sağlığı için faydalı özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. ÇO'nun antioksidan aktivitesi serbest radikallere karşı, hücre bileşenlerini koruması ile açıklanabilir. Çalışmamızda mononükleer lökositlerde oksidatif DNA hasarına karşı ÇO sulu ekstresinin potansiyel koruyuculuğunu değerlendirdik. Hücreler 37°C'de 30 ve 60 dakika süresince sulu ekstrenin farklı konsantrasyonları (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL) ile muamele edildi. Oksidatif stresin indüklenmesi için 5 dakika süre 10 ve 50 mM H₂O₂'ye maruz bırakıldı. Oksidatif hasar değerlendirilmesi DNA fragmentasyonu için alkali tek hücre jel elektroforezi (comet assay) kullanılarak yapıldı. ÇO sulu ekstresinin 100-25 µg/mL konsantrasyonları ile muamele DNA hasarını azalttı. Böylece H₂O₂ tarafından oluşturulan endojen DNA hasarına karşı hücresel koruma gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu sulu ekstresi, comet assay, mononükleer lökositler, *Nigella sativa*, oksidatif DNA hasarı

ABSTRACT
M.Sc Thesis

EFFECTS OF *Nigella sativa* AQUEOUS EXTRACT ON OXIDATIVE DNA DAMAGE

Şöhret YÜKSEK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

The black cumin (*Nigella sativa*) is claimed to have beneficial properties for human health, such as anti-bacterial, anti-carcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant activities. The antioxidant effects of the black cumin may be partly explained by protection of cell components against free radicals. We evaluated the effect of aqueous black cumin extract for its potential protecting agent against oxidative damage to DNA in mononuclear leukocytes. Cells were pre-treated with various concentrations (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL) of the extract for 30 min-60 min at 37°C. Cells were then exposed to 10 and 50 mM of H₂O₂ for 5 min as an induction of oxidative stress. Evaluation of oxidative damage was performed using alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay) for DNA fragmentation. Pre-treatments with black cumin extract reduced DNA damage at the concentrations of 100-25 µg/mL. Thus, black cumin showed cellular protection against endogenous DNA damage produced by H₂O₂.

Keywords: Black cumin extract, comet assay, mononuclear leukocytes, *Nigella sativa*, oxidative DNA damage

TEŞEKKÜR

Tezım boyunca bana her türlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni bu alışmaya teşvik eden değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar koşullarından yararlanmamı sağlayan Bölüm Başkanı Prof. Dr. Muhsin KONUK'a ve bana bu çalışmada yardımcı olan değerli hocalarım Doç. Dr. S. Elif KORCAN'a, Yrd. Doç. Dr. U. Cengiz ERİŐMİŐ'e, Arş. Gör. Dr. Recep LİMAN'a ve Arş. Gör. Feyza KUŐ ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca hep yanımda olan bana her zaman inanan, güvenen, destek olan, varlığı ile daima güç veren aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Şöhret YÜKSEK

AFYONKARAHİSAR, 2011

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 DNA Hasarı	3
2.2 DNA Tamiri ve Mekanizmaları	4
2.2.1 Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)	5
2.2.2 Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri.....	6
2.2.3 Replikasyon Sonrası (Post-Replikasyon) Tamiri.....	7
2.2.4 Acil (SOS) Tamir Sistemi	8
2.2.5 Çift Zincir Kırıklarının Tamiri.....	8
2.3 Oksidatif Stres.....	9
2.4 Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Fitokimyasallar	13
2.5 DNA Hasarı Belirlemede Kullanılan Yöntemler	16
3. MATERYAL ve METOT.....	19
3.1 Materyal	19
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	19
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	19
3.1.3 Bitki Materyali	20
3.1.4 Mononükleer Lökositler.....	20
3.2 Metod	20
3.2.1 Çörek Otu Sulu Ekstresinin ve Kullanılan Konsantrasyonlarının Hazırlanması	20
3.2.2 Kullanılan Çözeltiler	21
3.2.3 Mononükleer Lökositlerde DNA Hasarının Tek Hücre jel Elektroforez Tekniği ile <i>In-vitro</i> Tayini	22
3.2.4 İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR.....	25
4.1 Çörek Otu Mononükleer Lökositlerde H ₂ O ₂ ile İndüklenen DNA Hasar.....	25
Etkisine İlişkin Bulgular	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk:	Dakika
dL:	Desilitre
gr:	Gram
µL:	Mikrolitre
mL:	Mililitre
mg:	Miligram
mM:	Milimolar
mA:	Miliamper
M:	Molar
V:	Volt
⁰ C:	Santigrat derece
%:	Yüzde
<:	Küçüktür

Kısaltmalar

AP:	Apirimidinik / Apürinik bölge
ANOVA:	Tek yönlü varyans analizi
AU:	Görsel skorlama tekniği
CH ₃ :	Metil
COMET :	Tek hücre jel elektroforezi
ÇO:	Çörek otu
ÇOE:	Çörek otu ekstresi
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FISH:	Floresans İn Situ Hibridizasyon
G-C:	Guanin-Sitozin
HCl:	Hidroklorik asit
HR:	Homolog rekombinasyon
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
IgG:	İmmüoglobülin G
KCl:	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄ :	Dipotasyum hidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄ :	Dipotasyum fosfat
LMPA:	Düşük erime noktalı agar
LOOH:	Lipid hidroperoksit
MDA:	Malondialdehit
NaCl:	Sodyum klorür
NaOH:	Sodyum hidroksit
NMPA:	Normal erime noktalı agar
mG:	O6-Metilguanin
N7-meG:	N7-metilguanin
OH:	Hidroksil
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm:	Dakikadaki dönüş hızı

RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SH:	Standart hata
SSBs:	Tek iplik kırıklıkları
SSDNA:	Tek iplikli DNA
TUNEL:	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılığıyla dUTP son uç etiketlemesi
T-A:	Timin-Adenin
UV:	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 DNA hasarı sonucu oluşan süreç	4
--	---

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve kimlikleri.....	10
Çizelge 4.1 Hücrelerin maruz kaldığı sulu ekstre konsantrasyonları	25
Çizelge 4.2 Farklı seyreltmelerdeki ÇOE'nin H ₂ O ₂ 'nin oluşturduğu DNA hasarına (AU) karşı direnci.....	27

1. GİRİŞ

Bir organizmanın yaşamı için DNA'nın bütünlüğü ve kararlılığı esastır. Fakat en iyi koşullarda bile DNA iç ve dış genotoksik ajanlar tarafından devamlı hasara uğratılır. Oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir.

Günümüzde, bitkisel ilaç ve doğal bileşiklere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Gelişmiş ülkeler tarafından bitkilerin önemi fark edilmiş ve sonuç olarak da, bitkilerin faydalarına inanan insanların artışı ile bitkilerin tamamlayıcı ya da alternatif tıpta kullanımı da son derece artmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalarda meyve, sebze ve tahılların düzenli tüketimi kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların ilerleme riskini azalttığı belirlenmiştir (Silva *et al.* 2005, Tosetti *et al.* 2009). Burada doğal bitki kaynaklı olan gıdaların besleyici olmayan fitokimyasalların varlığı rol oynamaktadır (Tosetti *et al.* 2009, Zheng and Wang 2001).

İnsan diyetindeki mevcut olan çoğu fitokimyasal özel hedef ile etkileşime girmek için spesifik olarak hazırlanmış ilaçlardan farklıdır. Her fitokimyasal molekül birden fazla hedef molekül ile etkileşir. Bu yüzden farklı sinyal yollarında, genlerin ifadesinde ve çeşitli metabolik yolların modülasyonunda etkilidir (Raspor *et al.* 2005, Manach *et al.* 2009). Fitokimyasallar; polifenoller, terpenoidler, alkaloidler ve diğer azotlu bileşikler, karbonhidratlar ve yağlar olmak üzere birkaç ana gruba ayrılabilir. Bu bileşiklerin bazılarının serbest radikal süpürücü özellikleri belirtilmiştir.

Serbest radikaller nedeniyle kanser, diyabet, ateroskleroz, inflamasyon ve erken yaşlanma ortaya çıkmıştır (Silva *et al.* 2005, Manach *et al.* 2009). Serbest radikal süpürücü özelliği; antigenotoksik ve antiaging etkisinin yanı sıra, antioksidan aktivite ile de ilgilidir. Bu yüzden, antioksidanlar zincir reaksiyonlarının oksitleyici yayılımı ve inhibisyonunun başlamasıyla lipidlerin veya diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktirebilir veya engelleyebilir (Zheng *et al.* 2001) ve dolayısıyla genotoksisiteyi ve hücre yaşlanmasını önleyebilir.

Bu çalışmada, fitoterapide sıkça kullanılan *Nigella sativa* (erek otu) ekstresine ait değişik konsantrasyonlarının, *in vitro* insan mononukleer lokositlerinde, tek hücre jel elektroforez yöntemiyle, H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 DNA Hasarı

DNA'da meydana gelen olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değiştirebilir. İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir (Couladis *et al.* 2003).

Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları eksojen veya endojen olabilir. Eksojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, sigara ve birçok kemoterapötüği sayabiliriz. Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA'nın kendiliğinden değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V, D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin bir çoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz (İnt.Kyn.1).

DNA hasarı sonucu, DNA baz modifikasyonları, tek ve çift iplikli kırıklıkları, apürinik ve apirimidinik (AP) bölge oluşumu gibi DNA lezyonları, çoğu mutasyon sonucu, erken yaşlanma ve hatta hücre ölümleri meydana gelir (Nash *et al.*1996, Salmon *et al.* 2004, Milgrom *et al.* 2007).

DNA hasarının çeşitli türleri arasında AP bölgeleri en sık görülenleridir. Bir çalışmada normal insan karaciğer hücrelerinin genom başına yaklaşık 50.000 AP bölgelerinin mevcut olduğunu göstermektedir (Nakamura and Swenberg 1999). AP bölgelerinin bol olmasının yanı sıra, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engelleyerek genetik bilgi için büyük bir tehdit oluşturur (Friedberg 2003). AP bölgeleri N-glikozidik bağm kendiliğinden hidrolizi ile veya DNA'da N-glikozilaz enzimi tarafından hasarlı bölgelerin kaldırılması sonucu ortaya çıkabilir. Ayrıca, tek iplik kırıklıkları (SSBs) ile 3'-5' sonlanmalarının oluşumuyla DNA'da N-glikozilaz /liyaz ya da AP

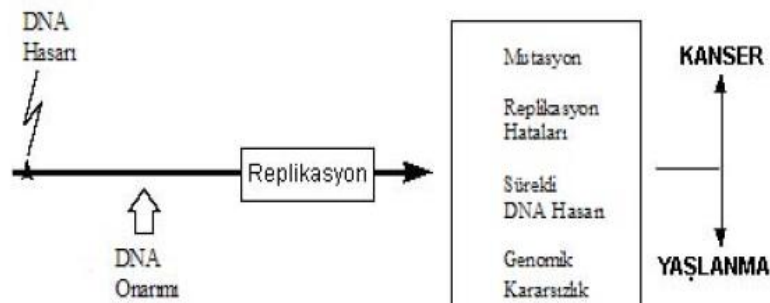
endonükleaz enzimleri tarafından AP bölgelerinin uzaklaştırılmasıyla bu bölgeler DNA polimeraz veya DNA ligazlar tarafından substrat olarak kullanılamaz hale gelmesine sebep olur (Krokan *et al.* 1997).

Hasarlı DNA, N7-metilguanin (N7-meG), 5,6-dihidroksi-5,6-dihidrotimin, urasil gibi lezyonların çeşitli ürünleri, normal bazların metilasyon, oksidasyon ve deaminasyonu ve 8-oxo-7,8- dihidroguaninin (8-oxoG) oksidatif hasarının ürünleri ile farklı yollardan meydana gelebilir (Boiteux and Guillet 2004).

8 oxoG mutajenez ve karsinojenez açısından önemlidir, çünkü adenin ile eşleşebilir ve G-C T-A transversiyonuna neden olabilir (Kelley *et al.* 2003). Mutajenik 8-hidroksiguanin lezyonları yaşlı ve kanser hücrelerinde yüksek düzeyde bulunur. Ayrıca, urasil gibi bazlar replikasyon ve onarım sırasında DNA'ya dahil edilebilir. Hücrelerin, DNA onarım ve tamir mekanizmalarını içermesi oksidatif DNA hasarının farklı DNA hasar tiplerini önler (Salmon *et al.* 2004).

2.2 DNA Tamiri ve Mekanizmaları

DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (Şekil 2.1) (İnt.Kyn.1).



Şekil 2.1 DNA hasarı sonucu oluşan süreç (İnt.Kyn.1)

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

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

A- Fotoreaktivasyon

B- O6-metilguanin tamiri

C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

A- Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

Replikasyon Sonrası (post-replikasyon) Tamiri

SOS Tamiri

Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

A- Serbest uçların non-homolog bağlanması (NHEJ)

B- Homolog rekombinasyon (HR)

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

A. Fotoreaktivasyon

UV-ışığın etkisiyle meydana gelen pirimidin (veya pürin) dimerleri, görünür ışıkla aktif hale geçirilen bir enzim (fotoliyaz) tarafından yok edilmesiyle meydana gelen olaydır. Fotoliyaz ışık enerjisini tutar ve örneğin timin dimerlerinin bulunduğu bölgede DNA'ya bağlanıp dimerler arasındaki kovalent bağları kırmakta kullanır; zarar görmüş bazıları doğrudan eski haline çevirir (İnt. Kyn. 1, İnt. Kyn. 2).

B. O6-metilguanin tamiri

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal

Guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev göremez hale gelir (İnt. Kyn. 1).

C. Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağına meydana getirir (İnt. Kyn. 1).

2.2.2 Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri

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

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

A. Baz eksizyon tamiri (BER)

DNA bazlarının kendiliğinden hidrolizi veya kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir. Bu sistem DNA glikozilazlar tarafından yürütülür. Enzim şeker-baz arasındaki bağı keser ve apürinik ya da apirimidinik bölge oluşturur. AP endonükleaz denilen başka bir enzim, bazını kaybeden bölgede şeker-P arasındaki bağı keser (İnt. Kyn. 1).

Deoksiribofosfodiesteraz denilen başka bir enzim bazın kaybedildiği yerin çevresini temizleyerek DNA polimeraz enziminin rahat çalışmasına olanak verir. Bu enzim de boşluğu kalıp zinciri kullanarak doldurur. Zarara uğramış DNA ipliğinin kusurlu bölgenin iki tarafında kesen bir endonükleaz tarafından iplikte bir kırık meydana gelir.

5'→3' eksonükleazın iplikteki kusurlu bölgeyi yok edilir. Boşluğun bir tarafında oluşan 3'-OH grubunu primer olarak, tamamlayıcı dizileri taşıyan zinciri de kalıp gibi kullanan DNA polimeraz tarafından yeni bir iplik sentez edilir ve DNA ligazın yeni sentez edilen parçanın 3' ucunu eski ipliğe kovalent biçimde bağlanır (İnt. Kyn. 1).

B. Nükleotid çıkarma onarımı (nucleotide excision repair / NER)

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

Kseroderma pigmentosum,
Cockayne sendromu,
Trikotiyodistrofi (İnt.Kyn. 2).

C. Hatalı eşleşme onarımı (mismatch repair)

Yanlış eşleşme onarım protein dimeri (MutS) DNA'yı tarayarak omurgadaki bükülmeden yanlış eşleşmeyi bulur. MutS yanlış eşleşme taşıyan DNA'yı kuşatır. MutS DNA kompleksi, MutL proteininin yapıya katılmasını sağlar. MutL yanlış eşleşmenin olduğu yerin yakınındaki bir zincirde bir kırılma (ya da çentik) meydana getirecek olan MutH enzimini aktifleştirir. Çentik oluşumundan sonra bir helikaz (UvrD) DNA'yı çözer ve bir ekzonükleaz zincirdeki büyükçe (1000-2000 nükleotid kadar) bir bölgeyi yok eder (İnt.Kyn. 2). Tek zincirli boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz tarafından kapatılır.

2.2.3 Replikasyon Sonrası (Post-Replikasyon) Tamiri

DNA hasarı diğer tamir sistemleri ile tamir edilememişse, replikasyondan sonra aktif olan mekanizmadır. Bir lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyon yerine gelerek duraklar. Hasarlı bölgeyi de içine alacak şekilde boşluk bırakarak atlar ve senteze devam eder. Rec A proteini, rekombinasyonel bir değiş tokuş işlemi ile

hasarsız komplementer zincirde bulunan sekansı transfer eder. Komplementer zincirde oluşan boşluk DNA polimeraz–DNA ligaz enzimleri sayesinde doldurulur (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

2.2.4 Acil (SOS) Tamir Sistemi

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. SOS yanıtında görev alan birçok proteini kodlayan genler normalde Lex A proteini tarafından baskılanmış durumdadır. DNA hasarı ile karşılaşıldığında, baskılanmış olan Rec A proteini hasarlı tek zincire bağlanır ve Rec A-ssDNA kompleksi oluşur. Rec A, DNA'ya bağlandıktan sonra Lex A proteininin otoproteolitik yıkımını aktive eder. Rec A, DNA polimeraza bağlanır ve lezyonu da geçerek DNA'yı replike etmesini sağlar. Rec A'nın, polimerazın 3'-5' ekzonükleaz aktivitesini inhibe etmesiyle translezyon replikasyon gerçekleşir. Hataya meyilli tamir sistemidir (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

2.2.5 Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

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

DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir. Bunlar serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog end joining) (NHEJ) ve homolog rekombinasyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleştirilebilir (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

A. Homolog olmayan uç birleşmesi

Eğer bölünmeyen bir hücrede çift zincir kırıkları oluşmuşsa kardeş kromatidler de kalıp olarak kullanılamaz ve bu kırıklar hiç tamir edilmemektense hatalı da olsa, hatta bazı baz dizileri kayıp bile olsa tamir edilirler (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

B. Homolog uç birleşmesi

Çift iplik kırıkları onarımının daha etkili bir yoludur. Homolog rekombinasyon kardeş kromatidleri kullanarak çift zincir kırıklarını onarır. Bu nedenle onarım hatadan arınmış bir onarımdır. Sağlam DNA'daki dizi bilgisi bir genel rekombinasyon mekanizması ile çift iplik kırığı olan bölgeye taşınır. Reaksiyon, eşleşen DNA dizilerini tanıyıp bir araya getiren rekombinasyon proteinlerini gerektirir (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

Bu komplementer dizi onarım reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacaktır. Komplementer dizi bulunduktan sonra homolog hasarlı ve hasarsız DNA arasında birleşik bir molekül yapısı oluşur. Hasarlı dizideki kaybolan dizi kardeş kromatiddeki diziden kopyalanır (İnt. Kyn. 1, İnt.Kyn. 2).

2.3 Oksidatif Stres

Bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren molekül veya molekül parçacıkları serbest radikal olarak adlandırılmaktadır (Berger 2005, Valko *et al.* 2006). Çiftlenmemiş elektron içeren serbest radikaller stabil olmayıp son derece reaktiftirler. Reaktif moleküller kararlı hale geçebilmek için elektron arar ve diğer moleküllerden elektron kopararak kararlı hale gelirler. Ancak elektronu alınan moleküller kararsız hale geçerek, serbest radikallere dönüşmektedir (Chauhan and Chauhan 2006).

Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine karşı koyabilmek için antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi

serbest radikallerin etkisini tamamen ortadan kaldıramaz ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Serafini 2004).

Çizelge 2.1. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri (Dündaroz vd. 2003).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H^{\bullet}	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH^{\bullet}	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O_2^{\bullet}	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif etkili
Perhidroksi radikal	HO_2^{\bullet}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO^{\bullet}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl_3	CCl_4 metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Tiol radikali	RS^{\bullet}	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO^{\bullet}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Azot dioksit	NO_2	NO^{\bullet} 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Canlı organizmada oluşabilen 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 yer alabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, süreli ve önemli miktarda üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler (Kılınç ve Kılınç 2002).

Serbest radikaller, hücrelerde DNA, lipid, protein, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli organik bileşikler üzerinde etki gösterirler. Serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküller lipidlerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri ortaya koyarlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) sebep olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonu "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" olarak tanımlanır.

Hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca 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 niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılması için geçiş metalleri iyon katalizi gerekmektedir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine de mevcut hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) oluşur. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif

aldehitlerle, dolaylı olarak da diğere hücre bileşenlerine zarar verirken doku hasarına ve pek çok hastalığa da sebep olmaktadır (Tietz 1995).

Çoklu doymamış yağ asitlerine göre proteinler, serbest radikallere karşı daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal zararlarından etkilenme derecesi amino asit dizilişleri ile ilişkilidir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirlerken; etkilenme sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikalleri oluşturur. Serbest radikallerin etkileri sonucunda, immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kalan prolin ve lizin aminoasitleri nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobinin de serbest radikallerin etkilerinden önemli oranda zarar görür. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumunu gerçekleştirir (Burtis and Ashwood 1999).

Serbest radikallerin DNA üzerinde yaptıkları hasar oldukça önemlidir. Serbest radikaller DNA'nın baz dizileri ile reaksiyona girerek DNA dizisinde hasarlar oluştururlar ve bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olurlar (Kaynak 2002). Yine serbest radikaller nükleik asitlere etki ederek temel yapıdaki çift sarmalın kırılmasına, sarmala yeni baz ve şeker gruplarının eklenmesine ve moleküller arasında çapraz bağların kurulmasına sebep olabilmektedir.

Hidroksil radikali, deoksiriboz şekeri ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek bir seri değişikliklere yol açmaktadır. DNA üzerine atakta bulunan hidroksil radikallerinin bir ürünü olan 8-hidroksi guanozinin varlığı insanda DNA hasarının bir göstergesidir. H_2O_2 ise membrandan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak, burada DNA hasarına, hücre fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne bile sebep olabilir.

Karbonhidratlar üzerinde de serbest radikallerin önemli etkileri bulunmaktadır. Otoksidasyon sonucu monosakkaritlerden; hidrojen peroksit, peroksitler ve

okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliği vardır. Bu özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece yaşlanma olaylarında ve kanserleşmede önemli bir etkendirler (Akkuş 1995).

2.4 Oksidatif Stres ve DNA Hasarını Önlemede Fitokimyasallar

İnsan sağlığı üzerine olumlu etkileri olan bitkisel kaynaklı (sebze, meyve ve tahıllar) biyolojik olarak aktif bileşikler fitokimyasallar olarak adlandırılır. “Fito” Yunanca’da bitki anlamına gelmektedir, “kimyasal” ise bitkilerde bulunan kimyasal bileşikleri belirtmektedir.

Fitokimyasalların kanser, koroner kalp hastalığı, diyabet, yüksek kan basıncı, enflamatuvar, viral ve parazitik hastalıklar, psikotik bozukluklardaki yararlı etkileri son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (PADA 1995, Dillard and German 2000). Fitokimyasallar sağlık üzerindeki olumlu etkilerini şu yollarla sağlar;

- biyokimyasal reaksiyonlarda substrat,
- enzimatik reaksiyonlarda kofaktör,
- bazı enzimatik reaksiyonların inhibitörü,
- bağırsaklarda zararlı ve istenmeyen maddeleri bağlayıp uzaklaştıran absorban/sekestran,
- hücre membranı ve hücre içinde bulunan reseptörleri agonize veya antagonize eden ligandlar olarak,
- reaktif toksik ajanları yakalayarak,
- esansiyel besin öğelerinin absorpsiyon ve stabilitesini arttırarak,
- yararlı gastro-intestinal bakterilerin çoğalmasını arttırarak,
- yararlı oral, gastrik ve intestinal bakteriler için substratları fermente ederek,
- zararlı mikroorganizmaları özgül olarak inhibe ederek (Dillard and German 2000).

Çoğu kronik hastalığın gelişmesinde serbest oksijen radikallerinin rolü olduğundan fitokimyasallar giderek daha çok önem kazanmaktadır. Tükettiğimiz sebze, meyve ve

tahıllarda yaklaşık 8000 farklı fitokimyasal vardır. Bitkilerde denge halinde bulunan çok sayıdaki bu fitokimyasalların yapay olarak taklit edilmesi zordur.

Oksidatif stresin artması büyük biyomoleküllere zarar verir, kalp hastalığı ve kanser riski artar. Oksidatif hasar değişik mekanizmalar ile tümör oluşumunda rol oynar. Serbest radikallerin yarattığı oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Fenol ve karotenoidler gibi çok çeşitli antioksidan bileşikler içeren sebze ve meyveler, hücreleri oksidatif stresten koruyarak kronik hastalık riskini azaltır (Prior 2003).

Hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bitkilerde bulunan karotenoidler, antioksidan vitaminler, fenolik bileşikler, terpenoidler, steroidler, indoller ve lif rol oynamaktadır. Çay kateşinleri, domates likopeni, yeşil yapraklı sebzelerden lutein ve zeaxanthin gibi bitkisel bileşikler de bunlara eklenebilir (Hasler 2002, Nishino *et al.* 2002).

Fitokimyasallar oksidan radikallerin yakalanması yanı sıra detoksifiye edici enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozuna ilişkin gen ekspresyonunu, hormon metabolizması ve antibakteriyal ve antiviral etkileri düzenleyerek de etkili olur (Bouic 2001).

ÇO Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller) familyasına ait, 20-30 cm yükseklikte, çiçeği mavimsi renkte bir bitkidir (Al-Awadi and Gumaa 1987). Kendi kendini döller ve çok sayıda beyaz ve üç kenarlı olan bir meyve kapsülü oluşturur. Bu meyve kapsülü olgunlaştığında, açılır ve içerisinde bulunan tohumlar havayla temasa geçer ve siyah renk alır (Tanker vd. 2004, Salem 2005).

Nigella kelimesi Latince siyahımsı anlamına gelen *nigellus*'tan gelmektedir. Ülkemizde bu bitki için ÇO, ekilen ÇO, kara ÇO ve siyah kimyon gibi isimler kullanılmaktadır (Baytop 1984).

Türkiye'de 14 *Nigella* türü yetişmektedir. Çoğunun kimyasal ve farmakolojik özellikleri henüz incelenmemiştir. Bunlardan *Nigella sativa*, *Nigella damascena* (Sam çörek otu)

ve *Nigella arvensis*'in (kır çörek otu) tohumları halk hekimliğinde ve baharat olarak daha yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Ülkemizde tarımı yapılan ve ticarete konu olan tek tür, yalnızca Black cumin, *Nigella sativa* L.dir (Seçmen vd. 1986).

ÇO'nun kimyasal yapısının belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemleri çok çeşitli olduğundan, kimyasal yapısı konusunda çok net tespitler yoktur (Türker ve Bayrak1997). ÇO tohumunun kimyasal yapısı, bitkinin hasat mevsimine, çeşidine ve yetiştirildiği iklime göre farklılık arz etmektedir. Ülkemizde yapılan bir araştırmada, ÇO tohumlarında % 6,4 su, % 4 kül, % 32 yağ, % 20,2 ham protein, % 6,6 ham lif ve % 37,4 karbonhidrat bulunduğu; sabit yağın % 1,2 miristik, % 8,4 palmatik, % 2,9 stearik, % 17,9 oleik, % 60,8 linoleik, az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerden oluştuğu bildirilmiştir (Nergiz ve Ötles 1993).

ÇO tohumunda ayrıca az miktarda B1, B2 ve B6 vitamini; proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler; iz elementler olarak bilinen ve organizmada pek çok önemli metabolik faaliyette rol alan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineraller de vardır. ÇO tohumlarındaki müessir madde (kristal hâlinde) nigellon 1959'da izole edilebilmiştir (Akhtar and Riffat 1991).

ÇO tohumlarının ham ekstre veya yağ biçiminde kullanıldığında antioksidan özellik gösterdiği ve potansiyel antitoksik tesiri olduğu anlaşılmaktadır (Nagi *et al.* 1999, Meral vd. 2001, Meral ve Kanter 2003, Türkdoğan vd. 2003, Alı 2004).

ÇO proteinlerinin antioksidan etki gösterdiği ve immün cevabı düzenlediği ifade edilmiştir (Badary 1999, Burits and Bucar 2000).

ÇO'nun çeşitli kanser hücrelerine sitotoksik etki ettiği, hücrel aktivasyonu arttırdığı ve tümör hücrelerine özgü antikorların sayısını arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, normal hücrelere olumlu etki gösterdiği belirtilmiştir (Swamy and Tan 2000, Medenica *et al.* 1993).

ÇO tohumlarının etkili bileşenlerinin antitümör etkiye sahip olduğu ve uçucu yağının farklı tipteki insan kanserli hücrelerinde etkisi çalışılmış ve MCF-7 meme kanserli hücrelerin sulu veya alkollü ekstrelere maruz bırakılması sonucu hücre büyümesi tamamen inaktive olmuştur (Salem 2005).

ÇO'ndaki aktif bileşiklerden taymokinonun ve ditaymokinonun anti kanser ilaçlara dirençli tümörlerde, tümör hücrelerini baskıladığı belirtilmiştir. ÇO ile inkübe edilen kanser hücrelerinin büyümek için ihtiyaç duydukları fibroblast büyüme faktörü ve kolajenaz proteini üretmedikleri belirtilmekte ve böylece tümör gelişimi durdurulabilmektedir (Capecka *et al.* 2004).

ÇO içeriğinde bulunan taymokinonun kanser tedavilerinde bazı toksik etkileri önleyebildiği gösterilmiştir. Böbreklere ve kemik iliğine belirgin toksik etkileri olan cisplatine adlı kemoterapi ilacı ile verildiğinde toksik etkilerde belirgin olarak azalma görülmektedir. Bu madde aynı zamanda karaciğeri ve böbrekleri karbon tetraklorid toksisitesine karşı da koruyabilmektedir. ÇO'nun bu etkileri göstermede antioksidan özelliğinin de önem taşıdığı belirtilmektedir (Capecka *et al.* 2004).

ÇO etkin maddesi olan taymokinonun aynı zamanda izole rat hepatositlerinde tetra-bütül hidroperoksid ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve intrasellüler glutasyon üretimini arttırdığı kantitatif olarak saptanmıştır (Daba ve Abdel-Rahman 1998).

ÇO'nun normal hücrelere toksik etkisinin olmadığı da bulunmuştur (Medenica vd. 1993).

2.5 DNA Hasarı Belirlemede Kullanılan Yöntemler

DNA hasarı maya, bitki, hayvan ve insanlar da dahil çeşitli organizmalar üzerinde çalışılan araştırma konusu olmuştur. DNA hasarı; kendiliğinden veya çevresel kaynaklı olabilir ve birçok yönden canlı hücreleri etkileyebilir (Azevedo *et al.* 2010, Yıldız vd. 2009, Keleş vd. 2010, Koçyiğit vd. 2005).

Oksidatif DNA hasarının önemini ve mekanizmasını anlamak için doğru ve kesin ölçümler gereklidir. Bu amaçla, geçmişten günümüze; immunokimyasal teknikler, kapillar elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (comet assay), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), TUNEL yöntemi, flow sitometri, FISH, kromatografi gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmıştır.

Comet assay düşük seviyelerdeki DNA hasarını bile belirleyebilmesinden dolayı diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Dhawan *et al.* 2009). Örnek başına hücre sayısının azlığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve kısa sürede çalışmanın tamamlanabilirliği açısından da avantajı fazladır. Buna ek olarak, hücrelerin hemen hemen her türü üzerinde çalışma yapılabilir.

Öte yandan Comet assay'in kendine has sınırlamaları vardır. DNA hasarının hücre döngüsü kontrol mekanizmaları üzerindeki etkileri gibi kanserojen ve epigenetik mekanizmalar için olası mekanizmaları olan anojenik etkileri tespit edilemez. Diğer dezavantajları tek hücre verisi, küçük hücreli numune (örnek önyargıya yol açar), teknik değişkenliği ve yorumudur. Ayrıca, hücreler arası değişkenlik, kültürler, çalışma için kullanılan hayvanlar, çeşitli analiz sistemleri, görsel skorlama veya farklı comet parametrelerinin kullanımı laboratuvarlar arası sonuçların farklı olmasında etkili diğer parametrelerdir (Dhawan *et al.* 2009).

Ancak, avantajları dezavantajlarından fazladır ve bu nedenle temel DNA hasarı ve onarım çalışmalarında (Dhawan *et al.* 2009, Collins 2004), genotoksisite testlerinde, (Collins 2004, Poli *et al.* 1999) ve insan biyoizleme (Dhawan *et al.* 2009, Collins 2004, Nemavarkar *et al.* 2004) çalışmalarında değerli bir aracı olarak kabul görmüştür. Ostling ve Johanson (1984) hücrelerin DNA hasarı ölçmek için ilk kez “ tek hücre jel elektroforezi veya comet assay ” olarak bilinen mikrojel elektroforez tekniği kullanmışlardır. Bu yöntemde, hücreler lam üzerindeki agaroz gömülür ve lizis solüsyonunda bekletilerek proteinler uzaklaştırılır ve daha sonra elektroforez çözeltisinde bekletilir. Bir florokrom ile DNA boyanır ve elektriksel alanda pozitif kutba yönelmesi ile kromatinin baş ve kuyruk oluşumu sağlanır. Hasarı fazla olan

DNA'da kuyruk uzunluğu daha fazla ve/veya kuyruktaki DNA yoğunluğu daha fazladır. Ancak nötr koşullarda sadece çift iplikli DNA kırıklıklarına bakılabilir. Daha sonra farklı hücrelerdeki çeşitli hasar tiplerini belirleyebilmek için bazı değişiklikler (lisis, elektroforez) yapılmıştır (Collins 2004). Bu yüzden, Singh vd. (1988), comet yöntemini alkali ortamda uygulamış ve hem tek iplik hem de çift iplik kırıklıklarını belirleyebilmişlerdir (Dhawan *et al.* 2009). Comet yöntemi şu an bireysel hücrelerde niteliksel olarak DNA hasar ve tamirini belirleyebilmek için kullanılan basit, çok yönlü, hızlı, görsel, hassas ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Dhawan *et al.* 2009, Collins 2004). DNA çapraz bağlantıları (örneğin, timidin dimerleri) ve oksidatif DNA hasarı gibi diğer bazı DNA hasar lezyonları spesifik DNA tamir enzimleri ve lezyon-spesifik antikörleri kullanılarak comet yöntemi ile belirlenebilir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

1. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
2. Floresan mikroskop (Olympus)
3. Işık mikroskobu (Olympus)
4. ± 4 °C Buzdolabı (Profilo)
5. -20°C Derin dondurucu (Uğur)
6. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
7. Vorteks (Nüve NM 110)
8. Pipetler (0,5-2 μ L, 0,5-100 μ L, 50-200 μ L, 200-1000 μ L, 1-5 mL) (Gilson)
9. Otoklav (Nüve ot 032)
10. Hassas terazi (Sartorius)
11. Distile su cihazı (Nüve)
12. Elektroforez düzeneği (Biolab)
13. Hotplate (Thermolyne)
14. pH metre (Hanna Instruments)
15. Thoma lamı (IsoLab)
16. İnkübatör

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

1. Normal erime noktasına sahip (NMPA, 65 °C) agaroz jel (Sigma)
2. Düşük erime noktasına sahip (LMPA, 37 °C) agaroz jel (Sigma)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
4. Sodyum klorür (Merck)
5. Potasyum klorür (KCl) (Merck)
6. Trizma base (Sigma)

7. Triton X–100 (Sigma)
8. Sodyum hidroksid (Merck)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
11. Etidyum bromür (Sigma)
12. Hidrojen peroksit (Merck)
13. Trizma HCl (Sigma)
14. Histopak–1077 (Sigma)
15. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Carlo Erba)

3.1.3 Bitki Materyali

Deneylemizde kullanılan ÇO Afyonkarahisar’da bir baharatçıdan temin edilmiştir.

3.1.4 Mononükleer Lökositler

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

3.2 Metot

3.2.1 Çörek Otu Sulu Ekstresinin ve Kullanılan Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Bir hassas terazide 1 gr ÇO tartıldı ve ÇO porselen havan yardımıyla ezildi ve boş bir behere alındı. Distile su ile 10 mL tamamlandıktan sonra 1 saat boyunca 100 °C’de bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğumaya alınan sulu ekstrenin sıvı kısmını elde etmek amacıyla bir santrifüjde dakikada 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant bir pipet yardımıyla başka steril bir boş tüpe alınarak stok olarak kullanıldı. Kullanım anına kadar stok sulu ekstre +4 °C’de saklandı (Bektaş 2010).

Deneilerimizde kullanılan sulu ekstre için 6 ayrı konsantrasyon hazırlandı. Bunun için altı ayrı tüp 1'den 6'ya doğru numaralandırılıp her sonraki tüpteki sulu ekstre konsantrasyonu iki kat seyreltme ile ayarlandı. İlk tüp, her sulu ekstre stok solüsyonu için 1/10 seyreltme oranı ile seyreltildi. Daha sonraki seyreltmeler 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 oranında idi.

3.2.2 Kullanılan Çözeltiler

Lizis tamponu: Lizis stok solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M sodyum klorid, 10 mM trizma base'den oluşmaktadır. Stok solüsyonun pH'sı değiştirilmedi. 100 mL çalışma solüsyonunu hazırlamak için de % 1 oranında triton X-100 ve % 10 oranında DMSO jöjeye alındı üzeri stok solüsyonla 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra çalışma solüsyonunun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı.

Elektroforez tamponu: Alkali elektroforez çözeltisi 1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit tartılıp 500 mL'ye tamamlandı ve pH < 13 olacak şekilde ayarlandı.

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

Etidyum bromür çözeltisi: 10 mg etidyum bromür 50 mL distile suda çözülerek 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik stok etidyum bromür çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 mL alınıp distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

H_2O_2 çözeltisi: % 35'lik H_2O_2 çözeltisinden 9,7 μL alınıp, +4°C'de 991,3 μL distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Çözelti 1 hafta buzdolabında saklanabilir. Deney günü 0,1 M H_2O_2 çözeltisinden 1 mL alınıp +4°C'de 10 mL ye tamamlanarak 10 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. 50 mM H_2O_2 çözeltisi içinse 0,1 M H_2O_2 çözeltisinden 5 mL alınıp +4°C' de 10 mL'ye tamamlanarak 50 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlandı.

Normal erime noktalı agaroz (NMPA) çözeltisi

0,02 gr NMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamların üzerine yayıldı.

Düşük erime noktalı agaroz (LMPA) çözeltisi: 0,01 gr LMPA tartılıp üzerine 2 mL 10X'lik PBS eklenip ısıtılarak % 0,5'lik LMPA çözeltisi hazırlandı.

Nötralizasyon tampon çözeltisi: 48,5 mg tris 750 mL distile suda çözülüp pH 7,5'e ayarlandı. Distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı (Koçyiğit vd. 2005).

3.2.3 Mononükleer Lökositlerde DNA Hasarının Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği ile *İn-vitro* Tayini

1. Steril enjektörle sağlıklı vericiden 3-4 mL kan örneği alındı.
2. Daha sonra ependorfların içerisine histopak kondu ve 1:1 oranında olacak şekilde kan yavaşça içerisinde histopak bulunan ependorflara eklendi.
3. Oda sıcaklığında 2000 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi.
4. Santrifüj işlemi sonunda histopak üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde yer alan lökositler pastör pipeti yardımıyla alındı.
5. Alınan lökositler ayrı ependorflara kondu ve üzerlerine PBS eklendi. 2300 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edildi.
6. Süpernatant atılarak dipteki hücre yoğunluğuna göre 0,5-1 mL PBS eklenip pastör pipetiyle yavaşça karıştırılarak homojen bir çözelti olması sağlandı. Bu homojen çözelti negatif kontrol olarak kullanıldı.
7. 100 µL hücre süspansiyonu ependorf tüplere alındı ve ezilip kaynatılarak hazırlanan çörek otunun 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 konsantrasyonları her bir ependorf tüpte 100 µL olacak şekilde eklendi. Daha sonra PBS ile son hacim 1000 µL ye tamamlandı.
8. İncelenen bileşikleri içeren hücre süspansiyonlarının $37\pm 0,5$ °C'de 30 dk ve 1 saat uygulamalar için bekletilerek inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda hücreler 2500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

10. Pozitif kontrol olarak 10 mM ve 50 mM H₂O₂ kullanılacak hücelere inkübasyondan sonra +4 °C'de 850 µL PBS ve 10-50 mM H₂O₂ çözeltilerinden 50 µL ilave edildi. 5 dk buz banyosunda inkübe edildi. +4 °C'de 2500 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
11. +4 °C'de 1 mL PBS ile 2500 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant atıldı.
12. 37±0,5 °C'de eritilmiş 75 µL % 0,5'lik LMPA, 25 µL hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı ve buzlu yüzey üzerinde 5 dk bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agar üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
13. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
14. Takiben elektroforez uygulandı.
15. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
16. Lamalar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Akım uygulamadan 20 dk bekletildi.
17. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dk elektroforez uygulandı.
18. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamalar 5 dk distile suda bekletildi.
19. Takiben lamalar 15 dk nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
20. Tüm bu işlemlere ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
21. Deney her bileşik için her konsantrasyon çift olmak üzere en az 3 kez tekrarlandı.
22. Lamaların üzerine 60 µL 20 µg/mL konsantrasyonda olan etidyum bromür çözeltisi ilave edildi.
23. Her lamada 100 hücre floresan mikroskopunda değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü olarak değerlendirildi (Singh *et al.* 1988, Tice *et al.* 1990).

3.2.4 İstatistiksel Analizler

Sonuçların istatistiksel değeriendirilmesinde SPSS Versiyon 11,5 (SPSS Inc. Chicago USA) for Windows paket programı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), Duncan çoklu dağılım testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Deneylemizde kullanılan ÇOE için 6 ayrı konsantrasyon hazırlandı. Bunun için altı ayrı tüp 1'den 6'ya doğru numaralandırılıp her sonraki tüpteki ekstre konsantrasyonu iki kat seyreltme ile ayarlandı. İlk tüp, ekstre stok solüsyonu için 1/10 seyreltme oranı ile seyreltildi. Daha sonraki seyreltmeler 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 oranında idi. Kullanım anında her 1000 µL hücre süspansiyonu içerisinde 100 µL seyreltilmiş ekstre solüsyonu olacak şekilde işlem yapıldı. Bu işlemler hesaba katılarak hücrelerin maruz kaldığı ekstre konsantrasyonları Çizelge 4.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücrelerin maruz kaldığı ekstre konsantrasyonları

Seyreltme Oranı	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Sulu Ekstre Konsantrasyonu (W/V) (µg/mL)	100	50	25	12,5	6,25	3,125

4.1 Çörek Otunun Mononükleer Lökositlerde H₂O₂ ile İndüklenen DNA Hasar

Etkisine İlişkin Bulgular

Çalışmamızda 100-3,125 µg/mL konsantrasyon aralığında (1/10-1/320 çözeltilerde) ÇOE'nin, 30 ve 60 dk inkübasyon sürelerinde, 10 ve 50 mM H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır.

30 dk ön inkübasyondan sonra 10 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda en yüksek DNA hasar skoru 127,33±12,66, 50 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda ise en yüksek DNA hasar skoru ise 137,33±6,93 olarak bulundu (Çizelge 4.2).

60 dk ön inkübasyondan sonra 10 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda DNA hasar skoru 9,66±2,72 ile 138±3,05 değerleri arasında; 50 mM H₂O₂ ile oluşturulan hasarda ise 9,66±2,72 – 145,66±3,17 değerleri arasında bulundu (Çizelge 4.2).

DNA hasarı değerlendirildiğinde, 100-25 µg/mL konsantrasyonlarda (1/10-1/40 çözeltilerde) ÇOE'nin, 30 ve 60 dk inkübasyon sürelerinde, 10 ve 50 mM H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarını önemli ölçüde azaltmıştır (p<0,05) ancak ortadan kaldırmamıştır (Çizelge 4.2).

12,5-3,125 µg/mL konsantrasyonlarda (1/80-1/320 çözeltilerde) ÇOE, 30 ve 60 dk inkübasyon sürelerinde, 10 ve 50 mM H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etki gösteremezken ekstre konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ÇOE'nin hasarı azaltmada etkili olduğu bunun yanında inkübasyon sürelerine göre de hasar derecesinin farklılık gösterdiği ortaya konmuştur (Çizelge 4.2).

10 ve 50 mM H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarında 100-50 µg/mL konsantrasyonlarda 30 dk inkübasyon süresinin 60 dk inkübasyon süresine göre DNA hasarını azaltmada daha etkili olduğu ancak 25-3,125 konsantrasyonlarda ise inkübasyon süresine göre hasar derecesinde azaltmada belirgin bir fark olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki ÇOE'nin H₂O₂'nin oluşturduğu DNA hasarına (AU) karşı direnci

UYGULAMA	30 dk	30 dk	60 dk	60 dk
	İnkübasyon	İnkübasyon	İnkübasyon	İnkübasyon
	+	+	+	+
	10 mM H ₂ O ₂	50 mM H ₂ O ₂	10 mM H ₂ O ₂	50 mM H ₂ O ₂
	X± SH*	X± SH*	X± SH*	X± SH*
PK	119,33±5,20 ^a	137,33±6,93 ^a	119,33±5,20 ^a	137,33±6,93 ^a
K	9,66±2,72 ^b	9,66±2,72 ^b	9,66±2,72 ^b	9,66±2,72 ^b
100 µg/ml	49,33±1,76 ^c	57,33±1,76 ^c	58,66±6,38 ^c	77±2,88 ^c
50 µg/ml	65,33±4,37 ^c	73,33±4,37 ^c	83,33±2,84 ^d	86,33±13,01 ^c
25 µg/ml	95,66±9,49 ^d	103,33±9,27 ^d	94±0,57 ^d	98,33±5,60 ^c
12,5 µg/ml	119,66±5,89 ^a	128±5,56 ^a	107±3,21 ^e	132,33±1,85 ^a
6,25 µg/ml	117±6,55 ^a	125,66±7,53 ^a	123,33±2,40 ^a	138,66±12,19 ^a
3,125 µg/ml	127,33±12,66 ^a	135±12,01 ^a	138±3,05 ^f	145,66±3,17 ^a

* Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)
X; Ortalama, SH; Standart Hata, PK; Pozitif kontrol, K; Kontrol

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkisel ürünler ve fitokimyasallarla gerçekleştirilen fitoterapi geçmişten günümüze kadar uygulanmaktadır. Günümüzde kullanılan pek çok ilaç etken maddesi kaynağını bitkilerden almıştır. Hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bitkilerde bulunan karotenoidler, antioksidan vitaminler, fenolik bileşikler, terpenoidler, steroidler, indoller ve lif rol oynamaktadır.

Yine bazı fitokimyasalların, *in vitro* test sistemlerinde mutajenik oldukları DNA hasarını indükledikleri bildirilmişse de bu durumun tersini bildiren bulgularda bulunmaktadır.

Fitokimyasallar oksidan radikallerin yakalanması yanı sıra detoksifiye edici enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozuna ilişkin gen ekspresyonunu, hormon metabolizması ve antibakteriyal ve antiviral etkileri düzenleyerek de etkili olur (Bouic 2001).

Çalışmamızda antioksidan özelliklerinden söz edilen, son yıllarda serbest radikal hasarı ile ilişkili bozuklukların ve birçok hastalığın tedavisinde yaygın kullanımı nedeniyle ÇOE'nin, *in vitro* insan mononükleer lökositlerinde, tek hücre jel elektroforez yöntemiyle, H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarını önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Sonuçta H₂O₂'nin DNA hasarlayıcı etkisine karşı ekstrelerin belirli dozlarda maksimum bir savunma hattı oluşturarak DNA hasarını önemli fakat farklı derecelerde azalttığı ortaya konulmuştur.

DNA hasarı değerlendirildiğinde, 100-25 µg/mL konsantrasyonlarda ÇOE'nin, 30 ve 60 dk inkübasyon sürelerinde, 10 ve 50 mM H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarını önemli ölçüde azaltmıştır (p<0,05) ancak ortadan kaldırmamıştır (Çizelge 4.2). Hücre kültürü ortamında ÇOE'nin DNA hasarının önlenmesiyle ilgili yapılan bir çalışmada, DNA hasarını maksimum azaltan konsantrasyonun 1,56 mg/dL olduğu belirtilmiştir (Bektaş 2010). Dolayısıyla ÇOE'nin konsantrasyonlarının artışına ve inkübasyon süresine bağlı olarak DNA hasarının önlenmesi değişiklik göstermektedir.

ÇO normal hücelere toksik etki göstermeyip koruyucu özellikte olmasının yanında, çeşitli kanser hücelere sitotoksik etki ettiği, hücrel aktivasyonu arttırdığı ve tümör hücelere özgü antikorların sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Swamy and Tan 2000, Medenica *et al.* 1993).

ÇO tohumlarının ham ekstre veya yağ biçiminde kullanıldığında antioksidan özellik gösterdiği ve potansiyel antitoksik tesiri olduğu anlaşılmaktadır. Bu tesiri aktif bileşiklerden olan taymokinonun ve ditaymokinonun gibi bileşikler sayesinde ve lipid peroksidasyon düzeyini düşürerek, antioksidan maddelerin seviyelerini artırarak antioksidan özellik gösterdiğine ilişkin araştırmalar bulunmaktadır (Medenica *et al.* 1993, Daba ve Abdel-Rahman 1998, Swamy and Tan 2000, Capecka *et al.* 2004). Çalışmamızda, H₂O₂'nin DNA hasarlayıcı etkisine karşı, bu aktif bileşiklerin bir savunma hattı oluşturarak DNA hasarını azalttığı düşünülebilir.

Dolayısı ile fitoterapide bu bitkinin, DNA hasarının neden olduğu hastalıklar oluştuktan sonra değil de, oluşmadan önce koruyucu olabileceğini gösterdik. Yine bu bitkiye ait aktif bileşenlerin ayrı ayrı çalışılmasıyla DNA hasarını önlemede etken maddenin ortaya konulması gerekmektedir. Çalışmamız *in vitro* bir çalışma olup *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Sağlık Dizisi, 5, ISBN:975-543-038-5, Konya.
- Akhtar, M.S. and Riffat, S. (1991). Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and “*Nigella sativa* seeds against cestodes in children. J Pak Med Assoc, 41, 8, 185-187.
- Al-Awadi, F.M. and Gumaa, K.A. (1987). Studies on The Activity of Individual Plants of An Antidiabetic Plant Mixture. Acta., Diabetol. Lat., **24**: 37-41.
- Ali, B.H. (2004). The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Chin Med*, **32**: 49 – 55.
- Azevedo, F., Marques, F., Fokt, H., Oliveira, R. and Johansson B. (2010). Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. Published online 8 September in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/yea.1820 *Yeast* 2011, **28**: 55–61.
- Badary, O.A., Al-shabanah, O.A., Naği, M.N., Al-rikabi, A.C. and Elmazar, M.M. (1999). Inhibition of Benzo(a)pyrene- induced Forestomach Carcinogenesis in Mice by Thymoquinone. *Eur. J. cancer Prev.*, **8 (5)**: 435-440.
- Baytop, T. (1984). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. Ü. Yayınları No:3255, İstanbul.
- Bektaş, İ. (2010). Hücre kültürü ortamında çörek otu (*Nigella sativa*) ve sarımsak (*Allium sativum*) ekstraktlarının DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

- Berger, M.M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally. *Clinical Nutrition*, **24**: 172-183.
- 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.
- Bouic, P.J. (2001). The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation. a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **4**: 471-475.
- Burits, M. and Bucar, F. (2000). Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. *Phytother. Res.*, **14 (5)**: 323-328.
- Burtis, C.A. and Ashwood, ER. (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja M. (2004). Antioxidant Activity Of Fresh And Dry Herbs Of Some Lamiaceae Species. *Food Chemistry*, **93**: 223-226.
- Chauhan, V. and Chauhan, A. (2009). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, **13**: 195-208.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* **26(3)**: 249-61.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C. (2003), Screening Of Some Grek. Aromatic Plants For Antioxidant Activity. *Phytotherapy Research*. **17**: 194-195.
- Daba, M.H. and Abdel-Rahman, M.S. (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett*, **95**: 23-29.

- Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.*, **25(1)**: 5-32.
- Dillard, C.J. and German, J.B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci Food Agric.*, **80**: 1744-1756.
- Dündaroz, M.R., Türkbay, T., Akay, C., Sarici, S.U., Aydın, A., Denli, M., Gökçay, E., (2003). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. *Turk J. Pediatr.*, **45**: 43-5.
- Friedberg, E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, **421 (6921)**: 436-40.
- Hasler, C.M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges a position paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.*, **132**: 3772-3781.
- Kaynak, K. (2002). Akciğer Kanserinde Oksidatif Stresin Rolü. *Solunum*, **4**: 468-473.
- Keleş, H., Fidan, A.F., Ciğerci, I.H., Küçükkurt, I., Karadaş, E., Dunder, Y. (2010). Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with Natural Marek's Disease, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 133, 151-158.
- Kelley, M.R., Kow, Y.W. and D.M. (2003), Disparity between DNA base excision repair in yeast and mammals: translational implications. *Cancer Res.*, 3rd, **63(3)**: 549-54.
- Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2002). Oksijen Toksikitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33(2)**: 110–118.
- Koçyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H., Erel O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res.*, **585(1-2)**: 71-8.

- Krokan, H. E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J.*, **325 (Pt 1)**: 1-16.
- Manach, C., Hubert, J., Llorach, R. and Scalbert, A. (2009). The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53(10)**: 1303-15.
- Medenica, R., Mukerjee, S., Huschart, T., Koffskey, J. and Corbit, W. (1993), *Nigella sativa* Plant Extract Increases Number and Activity of Immune Component Cell in Humans. *Exper. Hematol.*, **21(3)**: 1186.
- Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. (2001). Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally- induced diabetic rabbits. *Journal of Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical*,**48**: 593- 599.
- Meral, I.ve Kanter, M. (2003). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. On selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. *Biological Trace Element Research.* **96**: 263-270.
- Milgrom, E., Diab, H., Middleton., F. and Kane, P.M. (2007). Loss of vacuolar protontranslocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stres. *J. Biol . Chem.*, **282(10)**: 7125-36.
- Nagi, M.N., Alam, K., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Sawaf, H.A., Al-Bekairi, A.M. (1999). Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochemistry and Molecular Biology International* **47**: 153-159
- Nakamura, J. and Swenberg, J.A. (1999). Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res.*, **59(11)**: 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)**: 968-80.
- Nemavarkar, P.S., Chourasia B.K., and Pasupathy K., 2004, Detection of gamma irradiation induced DNA damage and radioprotection of compounds in yeast using comet assay', *J. Radiat Res (Tokyo)*, 45(2): p. 169-74.
- Nergiz, C. ve Ötles, S. (1993). Chemical Composition of *Nigella sativa* L. Seeds, *Food Chem.*, **48**: 259-261.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., *et al.*, (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*, **21**: 257-264.
- Poli, P., Buschini, A., Restivo, F.M., Ficarelli, A., Cassoni, F., Ferrero, I., and Rossi, C., (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests *Mutagenesis.*, **14(6)**: 547-56.
- PADA., (1995). (Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods). *J. Am. Diet. Assoc.*, **95**: 493-496.
- Prior R.L., 2003, "Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage", *Am J Clin Nutr*, **78(Suppl)**: 570S-578S.
- Raspor, P., Plesnicar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., Logar-Marinsek, R. and Poljsak, B. (2005). Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). *Cell. Biol. Int.*, **29(1)**: 57-63.

- Salem, M.L. (2005), Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. International immunopharmacology. **5 (13-14):** 1749-1770.
- 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):** 3712-23.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (1986). Tohumlu bitkiler sistemetiği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar serisi NO: 116. İzmir.
- Serafini, M., 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.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., 175, 184-191.
- Silva, C.G., Herdeiro, R.S., Mathias, C.J., Panek, A.D., Silveira, 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):** 229-33.
- Swamy, S. M. and TAN, B.K. (2000). Cytotoxic and Immunopotentiating Effects of Ethanolic Extract of *Nigella sativa* L. Seeds. J. Ethnopharmacol., **70(1):** 1-7.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2004). Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Yayınları. **88:** 199.

- Tice, R.R., Andrews, P.W. and Singh, N.P. (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci*, **53**: 291-301.
- 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)**: 1997-2003.
- Türkdogan, M.K., Ozbek, H., Yener, Z., Tuncer, I., Uygan, I., Ceylan, E., 2003, “The Role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the Prevention of Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats”, *Phytotherapy Research*, **17**: 942-946.
- Valko, M., Rhodes C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. **160**: 1-40.
- Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F., Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, **75(7)**: 934-938.
- Zheng, W. and Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric Food Chem.*, **49(11)**: 5165-70.

İnternet Kaynakları

1. <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>, 25.05.2011.
2. <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>, 25.05.2011.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şöhret YÜKSEK
Doğum Yeri ve Tarihi : Sandıklı, 03.10.1986
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0505 650 45 68, s-yukse@hotmai.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Süper Lise (2000-2004)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2005-2009)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2009-2011)