

***Chenopodium album.* METANOL EKSTRESİNİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Onur AKSOY
DANIŞMAN**

Doç. Dr. S. Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2011

Bu tez çalışması 10.FENED.08 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Chenopodium album. METANOL EKSTRESİNİN ANTİMİKROBİYAL VE
ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Onur AKSOY

DANIŞMAN

Doç. Dr. S. Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2011

TEZ ONAY SAYFASI

Onur AKSOY tarafından hazırlanan “*Chenopodium album* Metanol Ekstresinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 24/06/2011 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. S. Elif KORCAN)

Başkan	: Prof. Dr. Muhsin KONUK AKÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi,	İmza
Üye	: Doç. Dr. Hüseyin ENGİNAR AKÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi,	İmza
Üye	: Doç. Dr. S. Elif KORCAN AKÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi,	İmza

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

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Chenopodium album. METANOL EKSTRESİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Onur AKSOY

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. S. Elif KORCAN

Bu çalışmada *Chenopodium album* metanol ekstresinin, oksidatif stresten kaynaklanan DNA hasarına karşı koruma etkisinin ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite için; *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (NRS-744), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420), *Proteus vulgaris* (NRRLB-4420) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 11778) suşları kullanılmıştır. *Chenopodium album* metanol ekstresinin Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır. *Chenopodium album* metanol ekstresinin H₂O₂ ile muamele edilmiş insan mononükleer leukosit ve *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) hücreleri üzerine koruyucu etkisi Comet yöntemi ile *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Antioksidan içerik; total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasiteye (TOS) bakılarak değerlendirilmiştir. Bulgular ekstrenin önemli antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir.

2011, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, serbes radikaller, *C. album*, Comet, *S. cerevisiae*

ABSTRACT
M.Sc Thesis

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDAN CAPACITY OF
Chenopodium album METHANOL EXTRAXT

Onur AKSOY

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. S. Elif KORCAN

In this work, we aimed to both study the protective effect of methanolic *Chenopodium album* extract on DNA from oxidative stress and determination of its antimicrobial activity. The antimicrobial activity of the extract was tested against *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Basillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (NRS-744), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420), *Proteus vulgaris* (NRRLB-4420) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 11778). Our finding showed that methanolic extract of *Chenopodium album* have antimicrobial activity against both Gram (+) and G(-) bacteria. We have examined the potential protective effects of *Chenopodium album* extract against H₂O₂-induced genotoxic effects on both human mononuclear leukocyte and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) *in vitro*. These were evaluated by using alkaline single cell electrophoresis (SCGE, Comet assay). The antioxidant properties of the extract were assessed by determining total antioxidative capacity (TAC), total oxidative capacity (TOC) levels. These results suggested that the extract has a potent antioxidant activity and the comet assay is a robust and sensitive technique for detection of DNA damage in yeast cells.

2011, 78 pages

Key Words: Antioxidants, free-radicals, *C. album*, Comet, *S. cerevisiae*

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın belirlenmesinde, deneysel alışmaların ynlendirilmesinde, sonuların değerlendirilmesinde ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolayı tez danışmanım Sayın Do. Dr. S. Elif KORCAN'a, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK ve Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ'ye, materyal ve metot kısmında bilgilerinden yararlandığım Sayın Yard. Doç. Dr. Rui OLIVEIRA'ya, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Onur AKSOY

AFYONKARAHİSAR, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
RESİMLER DİZİNİ	X
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLER	3
2.1 <i>Chenopodiaceae</i> Familyası	3
2.1.1 <i>Chenopodium</i> L.	4
2.1.2 <i>Chenopodium</i> Türlerinin Kullanımı	4
2.2 Antimikrobiyallere Genel Bakış	6
2.2.1 Antimikrobiyallerin Etki Mekanizması	6
2.2.2 Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkili Faktörler	7
2.2.3 Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal Olarak Kullanım Alanları	8
2.2.3.1 Gıdalarda koruyucu olarak kullanımı	9
2.2.3.2 Tıbbi amaçlı kullanımı	9
2.2.4 Antimikrobik ve Kemoterapötik Maddelere Karşı Oluşan Bakteriyal Direnç	10
2.2.5 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	11
2.3 DNA Hasarı, Onarımı ve Antioksidanlar	13
2.3.1 DNA Hasarı	13
2.3.1.1 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	14
2.3.2 Serbest Radikaller	16
2.3.2.1 Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	16
2.3.2.2 Guanin Bazında Oksidatif Hasarın Mekanizması	17
2.3.3 Antioksidanlar	18
2.3.3.1 Doğal (Endojen) Antioksidanlar	20

2.3.3.2 Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar, sebze ve meyveler)	20
2.3.3.3 Enzimatik Antioksidanlar	20
2.3.3.4 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	22
2.3.4 DNA Onarım Mekanizmaları	24
2.3.4.1 Direkt Onarım ya da hasarın geri döndürülmesi	25
2.3.4.2 Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı	26
2.3.4.3 Rekombinasyonel Onarım	30
2.3.4.4 SOS Onarımı	30
2.3.4.5 DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı	30
2.4 Oksidatif Stresin Belirlenmesi ve Comet Yöntemi	32
3. MATEYAL ve METOT	34
3.1. Materyal	34
3.1.1 Kullanılan Test Mikroorganizmalar	34
3.1.2 Test İçin Kullanılan Bitki Materyali	34
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler	34
3.1.3.1 Normal kaynama dereceli agar (NMA)	34
3.1.3.1.1 Maya hücreleri için	34
3.1.3.1.2 Lökosit Hücreleri İçin	35
3.1.3.2 Düşük kaynama dereceli agar (LMA)	35
3.1.3.2.1 Maya Hücreleri İçin	35
3.1.3.2.2 Lökosit Hücreleri İçin	35
3.1.3.3 Sorbitol Tamponu	36
3.1.3.4 Litikaz Tamponu	36
3.1.3.5 Lizis Tamponu	36
3.1.3.5.1 Maya Hücreleri İçin	36
3.1.3.5.2 Lökosit Hücreleri İçin	37
3.1.3.6 Elektroforez Tamponu	37
3.1.3.6.1 Maya Hücreleri İçin	37
3.1.3.6.2 Lökosit Hücreleri İçin	38
3.1.3.7 Stok PBS Çözeltisi	38
3.1.4 Kullanılan Besi Yerleri	38
3.1.4.1 Katı ve Sıvı Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besi Yeri	38

3.1.4.2 Nutrient Agar - Nutrient Broth	39
3.1.5 Kullanılan Araç ve Gereçler	39
3.2. Metot	40
3.2.1 Bitki materyalinin ekstraksiyonu	40
3.2.2 Maya Suşunun saklanması	40
3.2.3 Comet Yöntemi ile DNA Hasarının ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	40
3.2.3.1 Maya Hücrelerinde	40
3.2.3.2 Lökosit Hücrelerinde	42
3.2.4 Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitelerin Araştırılması	43
3.2.5 Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerin Ölçülmesi	44
3.2.5.1 Total Oksidan Seviyesi (TOS)	44
3.2.5.2 Total Antioksidan Seviye (TAS)	45
3.2.6 İstatistiksel Analizler	46
4. BULGULAR	48
4.1 Antimikrobiyal Aktivite	48
4.2 Total Oksidan ve Antioksidan Seviye (TOS ve TAS)	52
4.3 Comet Yöntemi	53
4.3.1 Maya Hücrelerinde	53
4.3.3 Lökosit Hücrelerinde	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
6. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

nm	nanometre
mg	miligram
°C	Santigrat derece
mL	Mililitre
g	Gram
Zn	Çinko
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HOO [•]	Hidroperoksil Radikali
OH [•]	Hidroksil radikali
Cu ⁺²	Bakır +2 iyonu
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
Fe	Demir

Kısaltmalar

kob	Koloni Oluşturan Birim
TAS	Total Antioksidan Seviye
TOS	Total Oksidan Seviyesi
AU	Arbitrary Unit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
OD	Optik yoğunluk
LMA	Düşük kaynama dereceli agar
NMA	Normal kaynama dereceli agar
TCR	Transkripsiyona Bağlı Onarım
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
UV	Ultraviöle
GST	Glutation-S-Transferazlar
BER	Baz eksizyon onarımı
NER	Nükleotid eksizyon onarımı
SOD	Süperoksit dismutaz
MER	Yanlış eşleşme eksizyon onarımı
NHEJ	Serbest Uçların Homolog Olmayan Bağlanması
HR	Homolog Rekombinasyon
AP	Apürinik / Apirimidinik

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 Meydana gelen DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altındaki görüntüleri

43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Değişik <i>Chenopodium</i> türlerinin farklı ekstraktlarının etkileri	5
Çizelge 4.1 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin ($\mu\text{g/mL}$) gram negatif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etki sonuçları	50
Çizelge 4.2 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin ($\mu\text{g/mL}$) gram pozitif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etki sonuçları	51
Çizelge 4.3 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinde total oksidan ve antioksidan seviyelerin belirlenmesi	52
Çizelge 4.4 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin H_2O_2 ile indüklenen lökosit hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı direnci	54
Çizelge 4.5 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin H_2O_2 ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı direnci	54

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin <i>E. fecalis</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.	48
Resim 4.2 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin <i>L. monocytogenes</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.	49
Resim 4.3 <i>C. album</i> metanolik yaprak ekstresinin <i>P. aeruginosa</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları	50
Resim 4.4 Etidyum Bromid ile Boyanmış Maya DNA'larının floresan mikroskop görüntüsü	55
Resim 4.5 Etidyum Bromid ile Boyanmış Lökosit DNA'larının floresan mikroskop görüntüsü	56

1. GİRİŞ

Hücreler sıklıkla aktif oldukları dönem boyunca strese maruz kalırlar. Bu stresin hedeflerinden biri de genomik DNA'dır. Genomik DNA'nın bütünlüğü; ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA'da zarara neden olmaktadır. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm bu değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır (de Boer and Hoeijmakers 2000).

DNA'da hasara neden olan oksidatif stres; birçok hastalık, yaşlanma ve hücre ölümü ile de ilişkilidir. Serbest radikallerin fazlalığı, hücrelere hatta bunların DNA'sına zarar veren kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve kanser oluşumunda etkili olabilmektedir. Normal şartlarda hücrelerde oksidanlar ve antioksidanlar arasında korunan bir denge vardır. Fakat oksidanların aşırı üretimi veya antioksidatların azalması sonucu oluşan dengesizlik, anormal oksidan sisteme yol açar, böylelikle "oksidatif stres" oluşur. Oksidatif streste *in vivo* üretilen reaktif oksijen türevleri (ROT), DNA'da farklı mekanizmalarla; baz ve şekerlerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere (AP; apürinidik/apirimidinik bölge), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara neden olur (Halliwell 2002).

DNA'da meydana gelen hasar çeşitli onarım mekanizmaları ile giderilmeye çalışılır. Düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarı minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilir. Ancak DNA onarım enzimleri ve DNA polimerazın oksidatif stres altında hasara maruz kalmaları, doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığını azaltmaktadır. Onarım tamamlanıncaya kadar, hücreler bölünmelerini genellikle durdurarak kendilerini korumaktadırlar. DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında apoptozis gerçekleşmektedir (Burçak ve Andican 2004).

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmalarda antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma

mekanizmaları mevcuttur. Antioksidanlar serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Bağlanan iki serbest radikali birleştirerek nötralize edebilme özelliğine sahip bir enzime (glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz vb) taşınana kadar radikalle kararlı bir yapı sergiler (Halliwell and Gutteridge 2005).

Son 20 yılda hücre DNA'larında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Ancak Comet yöntemi gerek yüksek hassasiyete sahip olmasından gerekse ucuz ve uygulanması kolay olması bakımından tercih sebebi olmaktadır. Bugün bu yöntem Maya hücrelerine de kolaylıkla uygulanabilmektedir (Miloshev *et al.* 2002).

Bu çalışmada amacımız hidrojen peroksit ile indüklenmiş *Saccharomyces cerevisiae* ve lökosit hücrelerinde, *Chenopodium album* bitkisinin metanolik yaprak ekstresinin ne derece antioksidan kapasiteye sahip olduklarını karşılaştırmak, oksidatif strese karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin bulunup bulunmadığını Comet yöntemim ile belirlemek ve bunun yanında bu yaprak ekstrelerinin antimikrobiyal etkiye sahip olup olmadıklarını saptamaktır.

2. LİTERATÜR BİLGİLER

2.1. *Chenopodiaceae* Familyası

Bir, iki veya çok yıllık, çoğunlukla halofit ve sukkulent otsular veya çalılardır. Yapraklar alternat veya oppozit; tam, loplu veya pinnat parçalı, bazen silindirik ve etli, bazen pul şeklinde, stipülsüzdür. Çiçek durumu sık dikasyum, spika veya panikuladır. Çiçekler küçük ve braktesiz, erdişi veya tek eşeyli, aktinomorfudur. Periant tek serili 2-5 birleşik sepallerden oluşmuş olup petaller yoktur. Stamenler sepal sayısı kadardır. Pistil 1. Ovaryum üst durumlu, nadiren alt durumlu, 1 lokuluslu, 2-3 karpelli, tek ovüllü; plasentasyon bazaldır. Meyva periantla sarılmış olan küçük bir nuks veya kapsuladır (Özcan vd. 1992, Zeybek ve Zeybek 1994).

Familya üyeleri genellikle tek veya çok yıllık otsu bitkilerdir ve dünyanın birçok yerinde özellikle kurak yerlerde, tuzlu, kumlu, çakıllı topraklarda, sahil kenarlarında, azot ve potasyum nitrat bakımından zengin topraklarda, yol kenarlarında, tarla kenarı ve içleri gibi çok çeşitli alanlarda yayılış gösterirler (Akman vd. 2007, Yıldız ve Aktoklu 2010).

Ayrıca bu Familya üyelerinden bazılarının tarımı (*Spinacia*-ıspanak, *Beta*-pancar) yapılmakta, bazıları ise süs bitkisi olarak (*Chenopodium* cinsine ait bazı üyeler) bahçelerde yetiştirilmektedir (Yıldırım 2003, Yıldız ve Aktoklu 2010).

Chenopodium (kazayağı-16 tür), *Salsola* (sodaotu-15 tür), *Atriplex* (karapazı-14 tür), *Beta* (9 tür) ve *Suaeda* (sahil soda bitkisi-8 tür) ülkemizde en çok bulunan taksonlardır (Seçmen vd. 2004, Yıldız ve Aktoklu 2010).

Chenopodiaceae Familyası 102 kadar cins ve yaklaşık 1400 tür içermektedir. Ülkemizde doğal olarak yetişen 31 cins ve 99 türü bulunmaktadır (Davis 1982, Zeybek ve Zeybek 1994).

2.1.1 *Chenopodium* L.

Tüysüz veya glandular tüylü otsulardır. Çiçekler çok evcikli, spika, panikula veya dikasyum durumundadır. Periant parçaları yeşil veya zarımsı, bazen etlidir. Çoğunlukla ılıman bölgelerde yayılış gösterir ve 100'den fazla tür içerir. Ülkemizde 16 türü bulunur.

Bunların en yaygın olanları (Davis 1982, Özcan vd. 1992):

- *C. botrys* L. ,
- *C. foliosum*(Moenchl)Aschers. ,
- *C. album* L.'dir.

2.1.2 *Chenopodium* Türlerinin Kullanımı

Chenopodium album L. halk arasında kazayağgiller familyası olarak bilinen *Chenopodiaceae* familyasının bir üyesidir (Davis 1982). *Chenopodiaceae* familyasının aşağı yukarı 100 türü bilinmektedir. *Chenopodium* türleri Türkiye'de uzun zamandan beri halk ilacı olarak kullanılmakta olup yumuşak iklim bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir (Zeybek ve Zeybek 1994).

Eski zamanlarda, *Chenopodium ambrosiosides* ve *Chenopodium anthelminticum* türlerinin uçucu yağları çok zararlı bağırsak paraziti *Toenia echinococcus*'u ve diğer bağırsak kurtlarını düşürmekte kullanılmıştır. Ayrıca *C. graveolens* de parazitik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Montoya-Cabrera *et al.* 1996).

Arjantin halkı *Chenopodium* türlerini antialerjik, sedatif ve uyku verici (yatıştırıcı) olarak kullanmaktadır (Hernandez *et al.* 2000).

Genel olarak;

- *Chenopodium* türlerinden, ilaç ve besin endüstrisinde yararlanılır. Şeker elde edilir, sebze olarak yenilir (Özcan vd. 1992).
- *C. album* L. bitkisinin çiçekli dalları idrar arttırıcı ve müshil olarak kullanılır (Zeybek ve Zeybek 1994).
- *C. ambrosioides* askaridol bakımından zengindir ve zehirlidir. Kurt düşürücü olarak kullanılır (Zeybek ve Zeybek 1994).

Çizelge 2.1 Değişik *Chenopodium* türlerinin farklı ekstraktlarının etkileri (Neerja *et al.* 2007).

Tür	Bölüm/ Ekstrakt	Etki
<i>C. album</i>	Meyve (etanol)	Antiprütik Antinosiseptif
<i>C. ambrosioides</i>	Yaprak (metanol) Aerial kısımlar (aseton ve sulu ekstraktları) Aerial kısımlar (esansiyel yağ)	Antiprütik Antinosiseptif Antimikrobiyal Antihelmintik Tümör gelişimini engelleyici, Solucanlara karşı etkili
<i>C. amaranticolor</i>	Yaprak (etanol)	Antiviral Hemaglutinasyon
<i>C. quiona</i>	Tohum (sponin fraksiyonu)	Antifungal İmmünomodülatör
<i>C. botrys</i>	Aerial kısımlar (esansiyel yağ)	Antibakteriyal
<i>C. multifidum</i>	Aerial kısımlar (sulu ekstraktları)	Sitogenetik
<i>C. anthelmenticum</i>	Yaprak (esansiyel yağ)	Sitotoksik
<i>C. murale</i>	Yaprak (etanol) Aerial kısımlar (flavonoid)	Sitotoksik Hipotansiyon
<i>C. chilense</i>	Aerial kısımlar (metanol)	Spazmolitik

2.2. Antimikrobiyallere Genel Bakış

Antimikrobiyal maddeler, çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, “bakteriostatik” veya “fungustatik” olarak mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici olabildikleri gibi; “bakterisit” ve “fungisit” gibi mikroorganizmanın ölümüne sebep olan maddeler de olabilirler. Antimikrobiyaller, seçici toksisiteye sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zararlı olup, makroorganizmaya zarar vermezler (Schlegel 1992, Demain 1999).

“Antibiyotikler” antimikrobiyal etki gösteren doğal maddelerdir. Penisilin, sefalosporin ve makrolidler antibiyotiklere örnektir. Antibiyotiklerle aynı etkiyi gösteren, ancak sentetik olarak sentezlenen kimyasal bileşikler ise “kemoterapötik ajanlar” olarak adlandırılır. Sülfonamidler, kinolonlar, imidazoller bunlara örnektir. Bazı antibiyotikler veya türevleri kimyasal manüplasyonlarla sentezlenebilir (semi-sentetik antibiyotikler) (Saran ve Karahan 2010).

Yukarıda belirtilen terimler arasındaki tanımlar her zaman net çizgiler ile ayrılmayabilir. Bu nedenle, bu çalışmada, antibiyotik ve kemoterapötik terimlerinin ikisini de kapsamı nedeniyle “Antimikrobiyal” terimi kullanılmıştır.

2.2.1. Antimikrobiyallerin Etki Mekanizması

Antimikrobiyaller, etki mekanizmalarına göre beş sınıfta toplanırlar:

A. Hücre duvarı sentez inhibitörleri

1. Beta laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları)
2. Glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin)

3. Diğerleri (fosfomisin, sikloserin, basitrasin, ristosetin, ramoplanin, mersasidin, moenomisin)

B. Protein sentez inhibitörleri

1. 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (makrolidler, ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar)

2. 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler)

3. Diğerleri (mupirosin, nitrofurantoin)

C. Nükleik asit sentez inhibitörleri (kinolonlar, rifamisinler, metronidazol)

D. Antimetabolitler (trimetoprim-sülfametoksazol, paraamino salisilik asit)

E. Membran bütünlüğünü bozanlar

1. Peptid antibiyotikler (polipeptit antibiyotikler [basitrasin, gramisidin S, polimiksinler], lineer katyonik peptitler [defensinler, maganinler], ribozomal peptitler [lantibiyotikler], diğerleri [pirokorisin, drododoin, apiadesin])

2. Siklik lipopeptitler (daptomisin) (Saran ve Karahan 2010).

2.2.2 Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkili Faktörler

Antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olan ve yapılan çalışmaların çıktılarında farklılıklara neden olan faktörleri 5 grupta toplamak mümkündür (Negi *et al.* 1999, Davidson and Naidu 2000, Ultee *et al.* 2000, Bagamboula *et al.* 2003, Valero and Salmeron 2003, Nasar-Abbas and Halkman 2004, Tassaou *et al.* 2004).

1. Test edilen bitkisel kaynağın orijini, kompozisyonu, hasat zamanı, yetiştirildiği bölge, rakım vb. özellikler,

2. Test edilen mikroorganizma (suş, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, inokulum miktarı),
3. Çevresel faktörler (Sıcaklık, süre, oksijen),
4. Kullanılan metot (Mikroorganizma sayımı, besiyeri),
5. Besiyeri/gıdanın bileşimi (Yağ, protein, tuz ve su içeriği, pH) (Şahin 2006).

2.2.3 Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal Olarak Kullanım Alanları

İnsanlar ilk çağlardan beri kendi yöntemleri ile hangi bitkilerin tüketilebileceğini ve hangilerinin zehirli veya şifa verici (tıbbi) olduğunu öğrenmişler, toplama veya kültür yoluyla ürettikleri tıbbi bitkilerden, basit yöntemler kullanarak bitkinin esas etkili maddesini elde etmeyi başarmışlardır. Bitkiler, bu bakımdan insanların hem temel besin kaynakları hem de ilk ilaçlarıdır. Sistematikçilerin bildirdiklerine göre, bugün dünyada tanımı yapılmış yaklaşık 500 bin adet bitki bulunmaktadır. Bunlardan özellikle 500'e yakınının ekonomik amaçlı olarak ticaretinin yapıldığı, 20 bininin tıbbi amaçlar için kullanılabilirdiği, çeşitli yöntemlerle elde edilen bitkisel özütler ve uçucu yağlarının antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Sekonder bileşikler (alkoloidler, uçucu yağlar, glikozidler, flavanoidler, tanenler, fenoller, renk maddeleri ve reçineler) açısından zengin olan bitki türleri tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer almaktadır (Akgül 1993, Dorman and Deans 2000, Baydar 2005).

Yapay koruyucuların sağlık üzerine olan yan etkilerinden dolayı tüketicilerin doğal antimikrobiyal maddelere ilgisi artmış olup bu nedenle son yıllarda bitkisel maddelerin koruyucu etkileri üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır (Dorman and Deans 2000).

2.2.3.1 Gıdalarda koruyucu olarak kullanımı

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar halen önemli bir problemdir. Hastalık olaylarının içinde gıdalardan kaynaklananların oranı kayda değer olup, sadece Amerika'da yılda 9000'den fazla sayıda insan gıda kaynaklı patojenlerden ölmektedir (Mead *et al.* 1999). Gıda zehirlenmeleri kullanılan koruyucu yöntemlere rağmen, hem tüketicileri hem de gıda endüstrisini halen tehdit etmektedir. Bu nedenle, gıda kaynaklı hastalık olaylarının azaltılması için bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı araştırılarak bulunmuştur (Alzokery and Nakahara 2003). Sarımsak, tarçın, köri, hardal, fesleğen, zencefil ve diğer bazı bitkiler antimikrobiyal özellikler gösterdikleri belirtilmiştir (Marino *et al.* 1999). Ayrıca çoğu *Labiatae* familyasına ait olan aromatik bitkilerin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Elgayyar *et al.* 2001). Örneğin, Fesleğen, defne, karanfil, kekik ve biberiye'nin uçucu yağının *Listeria monocytogenes* ve diğer patojenlere karşı bakterisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (O'Gara *et al.* 2000). Nane, kimyon, rezene ve defne uçucu yağlarının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* üzerine bakteristatik etki gösterdiği belirtilmiştir (Akgül ve Kıvanç 1989).

2.2.3.2 Tıbbi amaçlı kullanımı

Yüzyıllardan beri yerli bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisinde tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır (Baydar 2005). Bileşenleri ve biyolojik etkileri yönünden de farklılık gösteren uçucu yağlar bu bakımdan önemlidir. Etken maddelere göre etkileri değişmekle birlikte pek çok uçucu yağ; antimikrobiyal karminatif, koloretik, sedatif, diüretik, antispazmodik özellikte etkilere sahiptir (Maksimovic *et al.* 2005). *Cinchona* spp, *Artemisia annua*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia vulgaris*, *Cochlospermum planchonii*, *Cochlospermum tinctorium*, *Jatropha curcas*, *Gossypium hirsutum*, *Euphorbia lateriflora*, *Khaya grandifolia* gibi bitkilerin kullanılması, sıtma hastalığında kullanılan ilaçlara karşı gelişen dirençliliği yok etmede ve ayrıca sıtma hastalığının

tedavisinde önerilmiştir (Yarnell and Abascal 2004). *Helicobacter pylori*, insanlarda gastroduodenal hastalıklarından sorumlu en önemli patojenlerden birisidir. Gastroduodenal hastalıkları geliştiren *H. pylori*'nin yok edilmesinde antibiyotiklerin kullanılması, bu antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç kazanımına yol açmıştır. Bundan dolayı *in vitro* ve *in vivo* denenilen bazı uçucu yağların etkisi araştırıldığında; *in vitro* olarak yağların %1'lik konsantrasyonda kullanıldığında *H. pylori*'nin çoğalmasını tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Farelerde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, *Lemongrass*'la muamele edilen farelerin midesindeki *H. pylori*'nin yoğunluğunda, muamele edilmeyenlere oranla önemli derecede düşüş olmuştur. Bu çalışma ile *H. pylori*'ye karşı dirençlilik gelişimini önlemede uçucu yağların kullanılabilceği, yeni ve güvenli bir anti-*H. pylori* ajan olabileceği ileri sürülmüştür (Ohno *et al.* 2003).

2.2.4 Antimikrobik ve Kemoterapötik Maddelere Karşı Oluşan Bakteriye Direnç

Antimikrobik kemoterapötik maddelere karşı bakterilerde iki tip direnç oluşur. Bunlardan ilki doğal (intrinsic) direnç diğeri ise edinsel (Non- intrinsic) dirençtir.

Doğal direnç, mikroorganizmanın temel özelliğidir. Bakterilerin birçoğunda, antimikrobik kemoterapötik maddeler kullanılmadan önce de var olan dirençtir. *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morgenella*, *Edwardsiella*, *Cedecea* cinslerinin polimiksinlere (polimiksin B ve kolitsin) karşı olan dirençleri doğal dirence örnek olarak verilebilir. Edinsel direnç de ise bakterinin öncelikle antimikrobik kemoterapötik madde ile karşılaşması gerekir. Duyarlı bir bakteri toplumunda edinsel direncin oluşması iki türlü olur.

A. Spontan kromozomal mutasyonla kazanılan direnç;

Kromozomal mutasyonlar spontan olarak her 10^{-1} hücre bölünmesi sonucu normal olarak meydana gelmektedir. Bu türlü mutasyonlar antimikrobik tedavi sırasında meydana gelebildiği gibi, ilaç alınmadığı zamanlarda da meydana gelebilir. Antimikrobik kemoterapötik maddeye mikroorganizmanın maruz kalması, dirençlilerin

hızla çoğalmasını ve duyarlı hücrelerin azalmasını, dolaylı olarak da yeni ve dirençli bir hücre topluluğunun ortaya çıkması sonucunu doğurur (Kılıçturgay vd. 1992).

B. Plazmid ve transpozonlar gibi kromozom dışı elementler yoluyla kazanılan direnç;

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak replike olan, kromozom dışı DNA parçacıklarıdır. R-plazmid adı verilen direnç plazmidleri, sayıları ona varan farklı antimikrobik kemoteropötik maddelere karşı direnç genleri taşımaktadırlar. Vücutta normal floranın plazmit transferine karşı bir koruma sağladığı anlaşılmıştır. Özellikle bağırsak florasının büyük bir kısmını oluşturan anaerob basillerin meydana getirdiği anaerob şartlar plazmit transferini engellemektedir.

Transpozonlar ise, bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizileridir. Bunlar bağımsız olarak replike olmamaktadırlar. Bu nedenle, kromozom ve Plazmit içinde bulunurlar. Kromozomlar ile plazmitler arasında gidip gelebilirler. Son yıllarda çoklu direnç genlerini taşıyan bakterilerde transpozonların rolleri olduğu düşünülmüştür (Kılıçturgay vd. 1992).

2.2.5 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antimikrobiyal bileşiklerin mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisi belirlenirken genellikle iki yol izlenmektedir. Bunlardan birincisi sürenin sabitlendiği, istenen inhibitör etkiyi sağlayan konsantrasyonun belirlendiği yöntemdir. Diğer izlenen yol ise konsantrasyonun sabit tutularak istenen mikrobiyal seviyeye ulaşılan sürenin belirlenmesidir (Marwan and Nagel 1986, Tassaou *et al.* 2004).

Antimikrobiyal etkiyi sağlamak üzere literatürde yer alan yöntemlerde;

1. Antimikrobiyal bileşeni içeren belirli bir çapa sahip kuyucuk ya da filtre kağıdının etrafında oluşan inhibisyon zonunun yarıçap ya da çapı,
2. Antimikrobiyal maddeyi içeren besiyerinde bakteriyel gelişimdeki azalma,
3. Sıvı besi ortamında bakteriyel gelişimi engelleyen minimum konsantrasyon,

4. Antimikrobiyal bileşeni içeren sıvı besi ortamının optik yoğunluğu ya da empedansındaki değişim ölçülmektedir (Nychas and Skandamis 2003, Tassaou and Nychas 2004).

Bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkileri araştırılırken laboratuvar kültür ortamlarından yararlanılmakta, türbidimetrik yöntemler, inhibisyon zonlarının ölçümü, biyomas ağırlıklarının belirlenmesi, mikroorganizma sayımları gibi farklı metotlar kullanılabilir. Ek olarak, diğer antimikrobiyal bileşiklerde olduğu gibi MIC ("minimum inhibitory concentration": minimum inhibisyon konsantrasyonları) belirlenerek de antimikrobiyal etkinlik değerlendirilebilir (Marwan and Nagel 1986, Tassaou *et al.* 2004).

Disk difüzyon yönteminde test edilen mikroorganizma ile inokule edilmiş katı agar üzerinde yer alan disk ya da oluşturulan havuzcuk/kuyuya antimikrobiyal eklenmektedir. Agar bünyesinde antimikrobiyalin tekdüze bir şekilde difüzlenebilme yeteneğine dayanarak inhibisyon zonları oluşmakta, bu zonların çapları ölçülerek antimikrobiyal etki hakkında bilgi edinilmektedir (Davidson and Parish 1989, Mann and Markham 1998, Nychas and Skandamis 2003, Kim *et al.* 2004).

Türbidimetrik yöntem tahrip edici olmayan, maliyeti düşük, hızlı ancak hassasiyeti düşük bir yöntemdir. Mikrobiyal gelişim eğrisinin üst kısımlarını tespit edebilmektedir. Besi ortamında canlı mikroorganizma sayımları ile sonuçları karşılaştırmak üzere kalibrasyon gerektirmektedir. Bakteriyel hücrelerin farklı gelişim aşamalarındaki sayısına göre absorbanstaki değişim ölçülmekte, mikrobiyal populasyon tahmin edilmektedir. (Nychas and Skandamis 2003, Tassaou *et al.* 2004). Spektrofotometrede anlamlı okumalar için 10⁶-10⁷ kob/mL seviyelerinde mikrobiyal yük gerekmektedir. (Davidson and Parish 1989, Kim *et al.* 2004).

İmpedimetrik yöntemde, bakteriyel gelişim ile düşük iletkenliğe sahip besin öğelerinin yüksek iletkenliğe sahip bileşenlere dönüşmesi sonucunda oluşan impedimetrik değişim ölçülmektedir. Türbidimetrik yöntemde olduğu gibi plak sayımları ile kalibrasyon gerektirmektedir (Nychas and Skandamis 2003, Tassaou and Nychas 2004).

Birden fazla konsantrasyonda test edilen antimikrobiyal bileşenin mikrobiyal gelişimi tamamen yok ettiği/engellediği en düşük konsantrasyon MIC olarak tanımlanmaktadır. MIC belirlemek için sıvı ya da katı agar besi ortamında antimikrobiyal dilüsyonlarının hazırlanması sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır (Kim *et al.* 1995, Mann and Markham 1998, Lambert *et al.* 2000). Bir antimikrobiyal için MIC değeri mikroorganizma, inkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı gibi analiz koşullarına bağlıdır (Tassaou and Nychas 2004).

E-Test yöntemi ise, agar difüzyon ve MIC değerini kantitatif olarak belirleme esasına dayanır. Gittikçe artan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren inert plastik şeritler kullanılır. 35°C de 18-20 saat inkübasyon uygulanır. Elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği nokta MIC değerini verir. Bu yöntem; birçok direnç mekanizması hakkında fikir veren, her klinik mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabilen, birçok hastalığın sağaltımı için yönlendirici olan bir yöntemdir (Tassaou and Nychas 2004).

2.3 DNA Hasarı, Onarımı ve Antioksidanlar

2.3.1 DNA Hasarı

Genomik DNA çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır ve replikasyon, rekombinasyon gibi hücrel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir (Orren and Sancar 1987, Sancar vd. 2004). Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır. DNA hasarı hücrede, ya hasarla başa çıkabilecek veya bunu gerçekleştiremediği takdirde programlı hücre ölümünü sağlayacak birçok hücrel olayı tetikler (Friedberg 1984).

2.3.1.1 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

a- Eksojen (çevresel) etkenler;

Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, hardal gazları gibi kimyasal ajanlar ve UV ışınları, iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar olarak belirtilmektedir (Altuntaş 2007).

b- Endojen (İçsel) etkenler;

Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar; deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler; depürinasyon/depirimidinasyon (10.000/hücre/gün) gibi kimyasal değişiklikler; baz kayıpları ve oksidatif hasar (100.000/hücre/gün) olarak belirtilmektedir. Onarım yapılmazsa somatik mutasyon görülür (Altuntaş 2007).

Çevre kirliliği, sigara, sürekli gelişmekte olan teknoloji, UV vb. pek çok diğer etken sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır (Asayama and Kato 1990). Bu etkiler sonucunda serbest radikaller oluşur. Bu nedenlerden dolayı dış etkilere bağlı oluşan hastalıklar artmakta ve genetik hastalıklar da çevresel etkilerin tetiklenmesi ile daha çok belirginleşmektedir (Lopez-Torres *et al.* 2000). Bu hastalıklara çözüm getirmek için ilaçlardan daha ziyade alınan besinler önem kazanmaktadır. Serbest radikallerin etkilerini önleyen ve diyetimizde sıkça bulunması gereken vitaminler kanser ve kalp hastalıkları gibi toplumda erken ölümlerin başlıca nedenleri olan hastalıkların oluşumunu önlemektedir (Bianchi *et al.* 1999).

DNA'da oksidatif hasarın bir göstergesi kabul edilen 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) hem sıçan karaciğer mitokondri DNA'sında hem de nükleer DNA'da analiz edilmiştir. Mitokondriyal DNA'da hasarın daha fazla saptanması mitokondride Reaktif oksijen türleri'in (ROS) daha fazla oluştuğu ve hasarın yeterince onarılmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Lopez-Torres *et al.* 2000). ROS ve Reaktif nitrojen türleri (RNS), DNA'da oksidatif hasar yaparak DNA'nın yapısal değişimine yol açar. İlk oluşan lezyon zincir kırıklarındır. Daha sonra baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme,

delesyon, baz katılımı, dizi amplifikasyonu gibi yapısal değişiklikler meydana gelir. Oksidatif modifiye DNA antijenik karakter taşıyabilir ve anti DNA antikorlarının oluşumuna neden olabilir (Dizdaroğlu 1991).

ROT ve RNS doğrudan DNA onarım enzimlerini ve DNA polimerazı okside etmektedir. Bu oksidasyonla, replikasyonun doğruluğu korunamaz ve DNA onarım mekanizmasının etkinliği azalır. ROT/RNS, DNA'da doğrudan hasar yaparak, sinyal transdüksiyonunu aktive/inhibe ederek, hücre proliferasyonunun kontrolünde çok önemli olan hücreler arası etkileşime etki ederek, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozis/nekroz ile hücre ölümüne müdahale ederek, kanser oluşumuna yol açabilir. DNA'da meydana gelen düşük düzeydeki oksidatif hasar ise, minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilir (Wu *et al.* 2004).

Hücreler UV ışınına maruz kaldığında DNA hasarı iki şekilde meydana gelebilir. UV ışını H_2O_2 'e etki ederek $\cdot OH$ radikalini meydana getirebilir veya doğrudan pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilir. $\cdot OH$ radikalleri yanında H^+ ve e^-_{aq} da 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 oluşturduğu ve bu yolla mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinmektedir (Dizdaroğlu 1991).

DNA'da meydana gelen hasar her zaman kanser ile sonuçlanmaz. Düşük düzeylerde hasar, etkin bir şekilde onarılırken, yüksek düzeylerdeki oksidatif hasar ise hücre ölümü ile sonuçlanır. Orta düzeydeki hasarın ise maligniteye yol açma olasılığı yüksektir. Bu gibi durumlarda antioksidan savunmanın güçlü olması, oksidatif strese karşı hücreyi korur (Floyd 1990).

2.3.2 Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron içeren kısa ömürlü, kararsız ve oldukça etkin moleküller olarak tanımlanmaktadır (Halliwell 1989, Loft and Moller 2006). Radikaller genom instabilitesi, yaşlanma, dejeneratif hastalıklar ve kanser gibi pek çok oluşumda rol almaktadır (Caporaso 2003).

2.3.2.1 Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Oksijenden oluşan serbest radikaller biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir. Yaşayan hücrelerde hem endojen hem de ekzojen süreçlerde devamlı reaktif oksijen türleri oluşur (Kim *et al* 2003).

Hücreler birçok faktörden dolayı ROT'lerine maruz kalabilirler. Örnek olarak, başta mitokondri elektron taşıyıcı sistem olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, inflamasyon, radyasyon, geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonlar, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları verilebilir (Loft and Moller 2006). Bunlara ek olarak bazı hastalıklarda inflamatuvar cevapta makrofajlar tarafından reaktif oksijenlerin programlı salınımı da olası oksidatif DNA hasar nedenlerindedir (Collins 1999). Oksidatif DNA hasarının yaşlanmada, Alzheimer hastalığında, diabette, aterosklerozda, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün inflamatuvar hastalıklarda ve kanser durumunda arttığını gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (Burçak ve Andican 2004).

Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. Günde 103 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülen DNA'nın yanı sıra, lipidler, karbohidratlar ve proteinler de oksidatif hasara uğramaktadır. (Burçak ve Andican 2004). Oksidatif mekanizmalar; karsinogenezin başlatıcı, geliştirici ve malign tümöre dönüşüm evrelerinde potansiyel bir role sahiptirler (Cooke *et al.* 2003).

Süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH^\bullet), nitrikoksit radikali (NO^\bullet), veya hidroperoksil (HOO^\bullet) gibi ROT'ler hücrede metal katalizli dönüşümden sonra veya doğrudan DNA'da hasar oluşturur (Boiteux and Radicella 1999). Hidroksil radikali çok reaktif olmasından dolayı hemen hemen her moleküle saldırarak hasar oluşturmaktadır (Halliwell 1989). O_2^- ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) ise doğrudan DNA ile etkileşerek baz oksidasyonuna veya DNA sarmal kırıklarına yol açmadığı ancak geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşan ve daha aktif bir tür olan hidroksil radikalının DNA hasarı oluşturduğu yapılan araştırmalarda görülmüştür (Dinçer ve Akçay 2000). Bu radikal DNA'da baz ve şeker hasarı, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir çok değişime neden olmaktadır (Jaruga and Dizdaroğlu 1996).

2.3.2.2 Guanin Bazında Oksidatif Hasarın Mekanizması

Oksidatif DNA hasar göstergesi olarak baz hasarlarının analizi son yıllarda sıklıkla yapılmaktadır (Burçak ve Andican 2004). DNA'nın dört farklı bazında serbest radikallerin reaksiyonu sonucunda 20 veya daha fazla ana ürün oluşmaktadır (Jaruga and Dizdaroğlu 1996).

OH^\bullet radikallerinin meydana getirdiği reaksiyonlar pürin ve pirimidin bazlarında değişikliklere neden olmaktadır. Cu^{+2} iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir (Burçak ve Andican 2004). 4, 5 veya 8. pozisyonlarında yer alan C atomlarına OH^\bullet radikali katılarak guanin bazından çeşitli ürünler oluşmaktadır (Cooke *et al.* 2003).

DNA'da yaklaşık olarak tanımlanan 15 adet guanin ürününden en fazla oluşan 7,8-dihidro-8-hidroksiguanin (8-OHG) ve FapyG'dir (Kim *et al.* 2003). 8-OHG, DNA'da ROT'leri tarafından üretilen en önemli lezyonlardan biridir ve üzerinde en çok çalışılan DNA hasar tipidir (Gimisis and Cismas 2006). Hücresel oksidatif stresin biyogöstergesi olarak kabul edilen 8-OHG, DNA zincirinin uzamasını engellememekte ancak DNA replikasyonu sırasında adenin ile yanlış eşleşme yaparak GC→TA transversiyonunu indüklemektedir (Le Marchand *et al.* 2002). Her memeli hücresinde günde yaklaşık 180

guanin okside olarak 8-OHG'e dönmemektedir (Elahi *et al.* 2002, Hu *et al.* 2005). Onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olmaları bakımından, oksidatif hasarın indüklediği mutasyonlar, hücre büyüme kontrolünü değiştirebilirler (Audebert *et al.* 2000).

Oksidasyonla hasarlanmış bir guanin olan 8-OHG'in hücre sel oksidatif metabolizma, iyonize radyasyon veya kimyasal karsinojenlere maruz kaldığında DNA'da çok miktarda üretilmektedir. DNA'da artmış olan 8-OHG miktarının da kanser riskini artırdığı belirlenmiştir (Chevillard *et al.* 1998, Sugimura *et al.* 1999).

2.3.3 Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkar (Rangan and Bulkley 1993).

Antioksidanların belirlenen ilk etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olduğundan, antioksidanlar ilk zamanlarda lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri de koruduğu anlaşılmıştır. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Rangan and Bulkley 1993, Yalçın 1998).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

1.Reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,

2.Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,

3.Metal iyonların bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,

4.Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler.

Yapılarına göre;

a)Enzimler

b)Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

Kaynaklarına göre;

a)Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)

b)Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

Çözünürlüklerine göre;

a)Suda çözünenler

b)Lipidlerde çözünenler

Yerleşimlerine göre;

a)Hücre içinde bulunanlar

b)Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar.

2.3.3.1 Doğal (Endojen) Antioksidanlar

Süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, hidroperoksidaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi gibi enzimatik savunma ve (enzim olmayan, lipid fazda veya sıvı fazda bulunan), vitaminler, glutatyon histedipeptit, melatonin, sistein, albimun vb. nonenzimatik savunma ile doğal antioksidanlar, toplayıcı etki göstererek, süperoksit, hidrojen peroksit gibi serbest radikalleri etkisiz hale getirir. Bununla birlikte toksit HO• oluşumunu da engeller (Warma *et al.* 1995).

2.3.3.2 Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar, sebze ve meyveler)

Endojen savunma sistemimiz bazı psikopatolojik durumlarda (sigara içmek, hava kirliliği, UV radyasyonu, yüksek oranda doymamış yağ asit diyeti vb.) ve reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda üretildiği yerlerde, oksidatif hasarı gidermek için diyet antioksidanlara gereksinim duyar (Wayner *et al.* 1987). Diyet yoluyla alınan antioksidanlar C, E, A. Vitaminleri ve karotenoidler yoğun bir şekilde incelenmiştir (Sies and Masumoto 1997). Bu bitkisel kökenli antioksidanların en önemli sınıfı polifenollerdir. Bu bileşikler bütün bitkisel yiyeceklerde bol miktarda bulunurlar, fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, kateşinler ve tanin içerirler (Warma *et al.* 1995).

2.3.3.3 Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz: Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. Süperoksit dismutazın insanlarda iki izoenzimi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren Cu.Zn-SOD ile mitokondrilerde bulunan tetramerik yapıdaki Mn içeren Mn-SOD'dır. Bu iki enzimden Cu.Zn-SOD siyanürle inhibe olurken, Mn-SOD siyanürden etkilenmez (Yu 1994, Cros *et al.* 1987).

Katalaz: Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Enzim peroksizomlarda yerleşmiştir. H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle veya H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır (Brent and Rumack 1993, Scandalios 2005).

Glutasyon Peroksidaz: Tetramerik yapıda olan, sitozolde bulunan ve 4 selenyum atomu içeren bir enzimdir. Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmüş olan bir diğer Glutasyon Peroksidaz, “fosfolipid-hidroperoksit glutasyon peroksidaz” enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir. Ancak monomerik yapıdadır. Zar yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirgeyerek, özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar (Drevet 2006).

Glutasyon S-Transferaz: Glutation-S-Transferazlar (GST) hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir (Drevet 2006).

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Mitokondriyal sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder. Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar (Yapar 2006).

2.3.3.4 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Askorbik asid (C vitamini): C vitamini, suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipidleri oksidasyona karşı korur. Askorbik asidin organizma için önemi, indirgeyici gücünün yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliği ile hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. C vitamini, Fe^{+3} 'i Fe^{+2} 'e indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisi ile proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali ($OH\bullet$) oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliği C vitamininin pro-oksidan etkili olmasına neden olmaktadır. Ancak bu etki düşük konsantrasyonlarda görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise büyük seviyede antioksidan etkisi görülmektedir. Bunların dışında C vitamini, fagositoz için de gereklidir (Burton and Traber 1989, Duarte and Lunec 2005).

Karotenoidler: Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır. Ayrıca LDL yapısında da yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler, hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar:

- a) Flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama,
- b) Singlet oksijeni baskılama,
- c) Peroksil radikallerini temizleme (Burton and Traber 1989).

Vitamin E (α -Tokoferol): E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Bunun yanında süperoksit ve hidroksil

radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. E vitamini ve selenyum birbirlerinin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Selenyum hem E vitamininin, hem de lipidlerin emilimi için gereklidir. Ayrıca, E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyum kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak organizmanın selenyum ihtiyacını azaltır. Benzer bir ilişki Glutasyon peroksidaz ile vitamin E arasında da vardır. Serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutasyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller (Burton and Traber 1990, Hathcock *et al.* 2005).

Polifenoller: Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir. Laboratuvar araştırmaları, çaydaki polifenollerin kanser oluşumunu önlemeye yardımcı olabildiğini ve var olan kanserin ilerlemesini engelleyebildiğini veya kanseri azaltıp yayılmasını önleyebildiğini göstermektedir. Bu etkinin, polifenollerin, DNA'nın zarar görmesine ve normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine neden olan oksidasyonu engelleme ve kanserojik bileşimlerin habisliğini artıran enzim aktivitelerini kısıtlama yetisinden kaynaklandığı sanılmaktadır (Yapar 2006).

Melatonin: En zararlı radikallerden $\cdot\text{OH}$ 'ini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi pro-oksidan aktivitesi de yoktur. Deoksiribonükleik asid hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir (Brzezinski 1997).

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

Seruloplazmin: Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

Albumin: Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler (Canbas 1983).

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

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

2.3.4 DNA Onarım Mekanizmaları

DNA'da meydana gelen onarım hatalarının, genomik kararsızlıklar sonucu oluşan kromozom instabilite sendromları ve kanser oranındaki artışa varan sonuçları doğurduğu düşünüldüğünde, DNA onarımının önemi anlaşılmaktadır. İnsanda DNA onarımı ile bağlantılı 130 genin klonlanması ve dizi analizi tamamlanmıştır (Tu *et al.* 1996, Griffiths *et al.* 2005). DNA onarım genleri iki alt gruba ayrılabilir:

- 1) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler,
- 2) Hatalı eşleşme onarımı, baz çıkarma onarımı, nükleotit çıkarma onarımı gibi ayrı onarım mekanizmaları ile ilgili genler (Tu *et al.* 1996, William and Michael 2002, Griffiths *et al.* 2005).

Bu genlerin yer aldığı onarım mekanizmaları başlıca beş grupta incelenebilir.

1. Direkt onarım ya da hasarın geri döndürülmesi

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

2. Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı

- a) Baz eksizyon onarımı (BER)
- b) Nükleotid eksizyon onarımı (NER)
- c) Yanlış eşleşme eksizyon onarımı (MER)

3. Rekombinasyon Onarım

4. SOS Onarımı

5. DNA çift Zincir Kırıklarının Onarımı

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

2.3.4.1 Direkt Onarım ya da hasarın geri döndürülmesi

- a) Fotoreaktivasyon

DNA'da meydana gelen hasarın geri döndürülmesi çoğu durumda termodinamik ve kinetik nedenlerden dolayı mümkün değildir. Bunun gibi bazı durumlarda enzim aracılığı (Fotoliyaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) ile gerçekleşen tek adımlı

reaksiyonlar hasarın onarılmasına yardımcı olur. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs), fotoliz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir. Bu reaksiyona fotoreaktivasyon denir. CPD fotolizler bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bulunur ancak plasentalı memelilerde bulunmaz (Geoffrey and Robert 2006).

b) O-6-metilguanin onarımı

Yüksek oranda mutajenik olan O-6-metilguanin, alkilleyici ajanlar varlığında oluşur. O-6-metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Bu onarım sırasında enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı da önem kazanmaktadır (Geoffrey and Robert 2006).

c) Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

X-ray ya da peroksidler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Meydana gelen bu basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen onarılmaktadır. Enzim enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5'fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağını oluşturarak onarımı gerçekleştirir (William and Micheal 2002, Geoffrey and Robert 2006).

2.3.4.2 Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı

a) Baz Çıkarma Onarımı

DNA'da oluşan hasarın direkt olarak geri döndürülmesinde, bazlarda meydana gelen her kimyasal değişiklik kendine özgü bir onarım mekanizması gerektirir. Ancak, hücreler birçok kimyasal hasar tipini düzeltebilecek genel bir onarım mekanizmasına gereksinim duyarlar. Bu da eksizyon onarımıdır (excision repair). Yanlış yerleştirilen ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır. Her yanlış baz

tipine özgün birçok yolak vardır. Bu yolaklar 2. ve 3. basamaklar ortak olmak üzere 3 adımdan oluşur (Frosina *et al.* 1996):

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir AP (Apürinik/ Apirimidinik) bölge oluşması. AP bölgeleri spontan olarak kaybolan ya da glikozilaz etkisiyle uzaklaştırılan DNA bölgeleridir. Bir memeli hücresi günde 10000 pürin ve 500 pirimidin kaybeder.

2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılması ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulması.

3. AP bölgesinin kesilip çıkarılarak (excision) uzaklaştırılması ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucunun uzatılması.

İnsan hücrelerinde çok sayıda DNA N-glikozilaz tanımlanmıştır. Diğer ökaryotik organizmalarda ve prokaryotlarda da benzer yapıda glikozilaz enzimi bulunmaktadır. DNA N-glikozilazlar, bazların yüksek afinite gösterdiği bağlanma bölgelerine sahiptirler. DNA sarmalı üzerinde hatalı eşleşmeden kaynaklanan bükülmüş yapıyı tanır, baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Bu iki etken birleşince yanlış eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması kolaylaşır.

DNA N-glikozilazlar ayrıca AP liyaz aktivitesine sahiptirler. Bu şekilde AP (Apirimidinik / Apürinik) bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler. Bir sonraki adımda AP endonükleazları 5'fosfodiester bağına hidroliz ederler ve uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozu uzaklaştırırlar. Son olarak, DNA polimeraz (polimeraz-β) tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır (Frosina *et al.* 1996).

b) Nükleotid Çıkarma Onarımı

Memelilerden mikoplazmalara kadar bir yelpazedeki organizmalar tarafından kullanılan, DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturarak birçok çeşit hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır. Özellikle heliks distorsiyonuna neden olan hasarların onarımında etkindir. İnsanlarda güneşten gelen UV ışığının karsinojenik etkilerine (dimerler) ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksit gibi etkenlerle reaksiyon sonucu oluşan büyük eklentili hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (Amundson *et al.* 2002). NER mekanizması şu şekilde işlemektedir;

1. Hasarın tanınması
2. Protein kompleksinin hasarlı bölgeye bağlanması
3. ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragment içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı zincirin kesilmesi (incision)
4. Degradasyon (hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılması)
5. DNA sarmalı üzerinde meydana gelen boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması
(polimerizasyon)
6. Ligasyon

Kalıtsal sendromları (Xeroderma pigmentosum/XP, Cockayne syndrome/CS, Trichothiodystrophy/TTD) olan bireylerde NER mekanizmasında bozukluklar saptanmıştır. Bu bireylerde güneşe duyarlılık, bazı dokularda erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidensinde artış gözlenir (Amundson *et al.* 2002, Van Hoffen *et al.* 2003).

Transkripsiyona Bağlı Onarım (TCR):

DNA'da oluşan hasar genomun her bölgesinde eşit etkinlikte onarılmaz. Genin transkripsiyona uğrayan zinciri aynı genin transkripsiyona uğramayan zincirine göre daha etkin olarak onarılır. Transkripsiyona bağlı onarım, RNA polimeraz II'nin (mRNA'yı sentezleyen enzim) bir DNA lezyonu ile karşılaştığında oluşan DNA

onarımıdır. Global genomik onarım (global genomic repair) ise transkripsiyondan bağımsız olan DNA onarımıdır. Transkripsiyona uğrayan gen bölgelerindeki timin glikollerinin, genomun herhangi bir yerindeki timin glikollerinden daha hızlı tamir edildikleri gösterilmiştir. Transkripsiyona bağımlı bu özellik, baz çıkarma onarımında (TC-BER) ve hatalı eşleşme onarımında da görülür (Bootsma and Hoeijmakers 1993, Brumer and Shakhnovich 2004).

c) Hatalı Eşleşme Onarımı

Hatalı eşleşme mekanizması; normal şekilde eşleşmesi gereken bazların hatalı eşleşmesinden kaynaklanan, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan hataları düzeltir. *E. coli*'yi örnek aldığımızda, 7 proteinden oluşan bir sistem tarafından hatalı eşleşmenin belirlendiğini görürüz. Bu proteinler, mutS, mutL, 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 saptanır. Replikasyon esnasında kalıp zincir metillenmiş olmasına rağmen yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık bir gecikme ile metillenir. Bu zaman sürecinde mutS, yeni zincirdeki hatalı eşleşen bazları tanır. Sırayla mutL ve mutH bir kompleks oluşturmak üzere sisteme katılırlar ve DNA boyunca çift yönlü olarak metillenmemiş bir GATC buluncaya kadar hareket ederler. MutH'deki endonükleaz fonksiyonu metil grubunun karşısında metillenmemiş zincire bir çentik atmak üzere aktive olur. Metillenmemiş zincir, ekzonükleaz I, SSB ve uvrD helikaz'ın birlikte hareketi ile uzaklaştırılır. DNA polimeraz III doğru DNA zincirini tekrar oluşturur ve ligasyon ile onarım sona erer. GATC bölgesi ile hatalı eşleşme arasındaki uzaklık en çok 1000 baz çifti olabilir. Bu nedenle hatalı eşleşme onarımı etkili bir onarım mekanizması değildir.

Ökaryotlar, *E.coli*'deki mut proteinlerine homolog proteinlere sahiptir. Ancak yeni sentezlenen zinciri ayırmak için *E.coli*'ye özgü metilasyon işleminin yerine kullanılan mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal nonpolipozal kolon kanserine (HNPCC) yatkın oldukları tespit edilmiştir (Schofield and Hsieh 2003, Stojic *et al.* 2004).

2.3.4.3 Rekombinasyonel Onarım

Replikasyondan sonra aktif olan ve DNA'ların zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak, tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı durumda görev alan 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. RecA proteini ise bu boşluğa bir yanıt olarak, 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 (William and Micheal 2002, Geoffrey and Robert 2006).

2.3.4.4 SOS Onarımı

DNA'da oluşan hasarın yüksek derecede olduğu ve mevcut onarım mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. Hücrelerde meydana gelen ciddi DNA zararlarına karşı acil yanıt olarak DNA onarım enzimlerinin sayısı artmaktadır. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Fakat replikasyonun doğruluğundan emin olunamaz. Bu sebeple hataya meyilli sistem olarak da adlandırılır (William and Micheal 2002, Geoffrey and Robert 2006).

2.3.4.5 DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı

DNA çift zincir kırığının kaynakları:

- İyonize radyasyon,
- Topoizomeraz inhibitörleri (etoposide, adriamycin),
- V(D)J rekombinasyonudur.

DNA'da oluşan hasarın en yıkıcı şekli olan DNA çift zincir kırıkları (DSBs), onarılmazsa kromozomların kırılmasına ve hücre ölümüne varan sonuçlar doğurabilir. Ayrıca yanlış onarılması durumunda da kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. DSBs'ye neden olan en önemli eksojen ajan iyonize radyasyondur. Ayrıca radon bozunumu ve antikanser ilaçlar da etkilidir. Oksidatif serbest radikaller oluşturan Bleomisin, Adriyamisin, Etoposid topoizomeraz II'yi inhibe ederek protein köprülü DSBs'ler meydana getirirler. DSBs oluşturan endojen ajanlar ise serbest radikaller oluşturan oksidatif metabolizma ve V(D)J rekombinasyonudur. V(D)J rekombinasyonu B ve T lenfositlerini kodlayan genlerin düzenlenmesi esnasında DSBs oluşturur. DSBs'in onarımı için 2 yol vardır (Haber 2000).

a) Homolog Rekombinasyon

DNA çift zincir kırıkları, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığıyla tamir edilir. Mayada bu yol çift zincir kırığı onarımında baskın olarak kullanılır. İnsanda homolog olmayan uç bağlanması ile eşit önemlidir (Haber 1999, 2000).

b) Homolog olmayan uçların bağlanması

Homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanmasının biyokimyasal bir yoludur. Çünkü kırık DNA uçları bağlanabilir durumda olmayabilir ve bu yol bazen genetik bilgide kayba da neden olur. Homolog olmayan uç bağlanmasındaki hatalar iyonize radyasyon duyarlılığına ve immün yetersizliğe neden olur. X ışınları ve peroksitler gibi bazı kimyasallar DNA omurgasında kırıklara neden olurlar. Tek zincirdeki basit kırıklar DNA ligaz tarafından onarılır. Ancak, DNA ligaz, sadece, 5'-fosfat ve 3'-hidroksil gruplarına sahip uçları birleştirebilir (Haber 1999, 2000).

2.4 Oksidatif Stresin Belirlenmesi ve Comet Yöntemi

Son 20 yılda hücre DNA'sında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde birtakım analitik teknikler; immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Comet testi), ³²P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elusyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) kullanılmaktadır (Dizdaroglu vd. 2002).

Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, tek hücre jel elektroforezi (Comet testi) bir çok avantaja sahiptir. Düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek duyarlılığı, çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlaması, kısa sürede, kolay uygulanabilir olması ve düşük maliyeti açısından tercih edilen bir yöntemdir. Bunlara ek olarak, Comet testi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, tek zincirde, ikili zincirde ve alkali labil bölgelerde DNA hasarını ölçmesinin yanında, spesifik endonükleaz lezyonlarının tanımı, UV'ye uğramış pirimidin dimerlerini, oksidize bazları ve alkalizasyon hasarlarını saptaması nedeniyle de yaygın olarak kullanılmaktadır (Tice *et al.* 2000).

Comet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturduklarından yöntemine İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir (Lin *et al.* 2007, Dikilitaş vd. 2009, Gichner *et al.* 2009).

Tek hücre jel elektroforez veya Comet analiz yöntemi ilk kez Östling ve Johansson (1984) tarafından temelleri oluşturulmuş bir yöntem olup, daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur (Singh *et al.* 1988, Gichner *et al.* 2008). Metot öncelikle alkali ortamlarda uygulandığı için alkali comet analizi ya da alkali tek hücre jel elektroforezi şeklinde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, N/N (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve A/N (Alkali gevşeme/Nötr elektroforez) şeklinde de uygulanmaya başlanmıştır (Lin *et al.* 2007). Metodun alkali versiyonu, A/A (Alkali gevşeme/Alkali elektroforez, pH 13) DNA'nın çift ve tek sarmal yapıda olan hasarlarını ölçmek için kullanılmaktadır (Gichner and Plewa 1998, Lin *et al.* 2007). Sadece genotoksik ve mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, bu çalışma konuları içinde de yer alabilecek önemli bir yöntemdir (Achary *et al.* 2008, Dikilitaş vd. 2009).

Bugün Comet yöntemi Maya hücrelerine başarı ile uygulanmaktadır. Bu yönetimi *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine uygulamak pek çok avantajı birlikte getirir. Gerek çabuk gelişen bir organizma olmasından, gerekse kültürünün ucuz ve kolay elde edilebilir olmasından dolayı bu organizma tercih edilmektedir. Günümüzde, dünya genelinde alınan önleyici kararlar ile birçok hayvanın kimyasal deneylerde kullanılmasına kısıtlama getirilmektedir (Rank *et al.* 2009). Bu sebepten dolayı, *Saccharomyces cerevisiae* bu problemin çözümü olabilir. Çünkü yüksek ökaryotlar ile mayalar, transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve DNA onarım mekanizmaları bakımından benzerlik gösterirler. İnsanlarda çeşitli hastalıklarla ilgili olan genlerin yaklaşık %30'u maya genleri ile eşleşmekte, insan hücrelerinin tersine, maya genleri moleküler biyoloji teknikleri ile kolayca manipüle edilmektedir (Silva *et al.* 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Test Mikroorganizmalar

Yeast Comet Assay olarak da adlandırılan bu çalışmada, ilgili tüm bölümlerde, Portekiz Minho Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden temin edilen *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 suşu (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) kullanıldı.

6 mm çapındaki antibiyotik disklerin kullanıldığı antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde ise, gram pozitif bakteriler olarak: *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (NRS-744), gram negatif bakteriler olarak: *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420), *Proteus vulgaris* (NRRLB-4420), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 11778) kullanıldı. Tüm test mikroorganizmalar, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden temin edildi.

3.1.2 Test İçin Kullanılan Bitki Materyali

Bu çalışmada, *Chenopodium album* türünün yaprak ekstraktları ile çalışıldı. Bitkiler Ağustos ayında, Afyonkarahisar ili, havaalanı çevresinde, bahçe içleri ve yol kenarlarından toplanmıştır.

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1 Normal kaynama dereceli agar (NMA)

3.1.3.1.1 Maya hücreleri için (% 0,5)

NMA (Sigma, A 4718)	0,01 g
Sorbitol Tamponu	2,00 mL

3.1.3.1.2 Lökosit Hücreleri İçin (%1)

NMA	0,02 g
PBS	2,00 mL

Belirtilen oranda alınan maddeler ateşte kaynayana kadar ısıtılarak homojen bir çözelti elde edildi. Sıcak bir şekilde, ikinci veya üçüncü yüzeylerin tutturulması amacıyla lamaların üzerine yayıldı.

3.1.3.2 Düşük kaynama dereceli agar (LMA)

3.1.3.2.1 Maya Hücreleri İçin (% 1,5)

LMA (Sigma, A 9414)	0,03 g
Sorbitol Tamponu	2,00 mL

3.1.3.2.2 Lökosit Hücreleri İçin (% 0,8)

NMA	0,016 g
PBS	2,00 mL

Şeklinde hazırlanan maddeler ateşte kaynayana kadar ısıtılarak homojen bir çözelti elde edildi. Ilık bir şekilde, hücrelerin agaroz jele tutunmasını sağlamak amacı ile NMA ile kaplı olan lamellere yayıldı.

3.1.3.3 Sorbitol Tamponu

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

Belirtilen ölçüde alınan maddeler distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. pH 6,5 olarak ayarlandı. Comet yönteminde, hücrelerin yıkanması işleminde kullanıldı.

3.1.3.4 Litikaz Tamponu

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

Belirtilen ölçülerde oluşan karışım 5 mL'lidir. Comet yönteminde, maya hücre duvarının parçalanması ve sferoplastların elde edilmesinde uygulandı.

3.1.3.5 Lizis Tamponu

3.1.3.5.1 Maya Hücreleri İçin

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

Maddelerinden tartılarak distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. pH 10 olarak ayarlandı.

3.1.3.5.2 Lökosit Hücreleri İçin

2.5 M NaCl	26,46 g
100 mM EDTA	6,696 g
10 mM Trizma Base	0,216 g

Maddelerinden tartıldı ve distile su ile 180 mL'ye tamamlandı.

- **Çalışma çözeltisi**

% 1 Triton X-100 (Sigma, T 8787)	0,20 mL
%10 DMSO (Sigma, D 8418)	10,00 mL

Hacimlerinde alınarak balon jöjeye alındı. Üzerine 20 mL stok PBS çözeltisi eklendi. Her çalışmadan önce taze hazırlanarak Lizis çözeltisi üzerine ilave edildi.

Her iki Lizis çözeltisi de Comet yönteminde, hücrelerin Lizise uğraması amacı ile kullanıldı.

3.1.3.6 Elektroforez Tamponu

3.1.3.6.1 Maya Hücreleri İçin

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

Tartılarak maddeler distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. pH 10 olarak ayarlandı.

3.1.3.6.2 Lökosit Hücreleri İçin

300 mM NaOH	6,00 g
1 mM EDTA	0,18 g

Belirtilen oranda tartılan maddeler distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. pH 13 üzeri olacak şekilde ayarlandı.

Her iki çözelti de sarmal yapıda olan DNA'nın çözülüp gevşemesine yardımcı olmaktadır.

3.1.3.7 Stok PBS Çözeltisi

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
Tris-HCl	1,60 g

Maddelerinden tartıldı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 10 kat dilüe edilerek kullanıldı. Comet yönteminde, kan hücrelerinin yıkanması amacı ile uygulandı.

3.1.4 Kullanılan Besi Yerleri

3.1.4.1 Katı ve Sıvı Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besi Yeri

	Katı YPD Besi Yeri	Sıvı YPD Besi Yeri
Maya ekstraktı (Fluka, 92144)	10,00 g	10,00 g
Pepton (Fluka, 70173)	20,00 g	20,00 g

Dekstroz (Sigma, D 9434)	20,00 g	20,00 g
Agar (Sigma, A 1296)	20,00 g	-

Maddelerinden tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı ve hücrelerinin üretilmesinde kullanıldı.

3.1.4.2 Nutrient Agar - Nutrient Broth

	Nutrient Agar	Nurtient Broth
Pepton (Fluka, 70173)	5,00 g	5,00 g
Et ekstraktı (Fluka, 70164)	3,00 g	3,00 g
Agar (Sigma, A 1296)	12,00 g	-

Tartılan maddeler distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için test mikroorganizmaların üretilmesi amacı ile hazırlandı.

3.1.5 Kullanılan Araç ve Gereçler

Derin Dondurucu (-200C) (Ariston)

Derin Dondurucu (-800C) (Revco)

Elektroforez (Biometra Analitik)

Elektroforez Güç Kaynağı (Power Pack P 25)

Etüv (Dedeoglu)

Floresan Mikroskop (Olympus)

Hassas Terazî (AND)

İnkübatör (Heraeus)

Lam (26x76mm) ve Lamel (24x60mm) (Marienfeld)

Manyetik Karıştırıcı (Stuart Scientific,7801Dottingen,M-21)

Mikropipetler 0-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl (Finnpipette,Gilson,Biohit)

Mikrosantrifüj (Heraeus)

pH metre (Cyberscan)

3.2 Metot

3.2.1 Bitki materyalinin ekstraksiyonu

Chenopodium album bitkisinin yaprakları ilk aşamada herbaryum ortamında kurutuldu ve mikser yarımı ile öğütülerek toz haline getirildi. Daha sonra Sokslet cihazında kullanılmak üzere yapraklardan 30'ar gram tartıldı. Sokslet ile ekstraksiyonda çözücü olarak, 30 g bitki materyali için 300 mL metanol kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi 24 saat sürdü. Bu işlemden sonra, elde edilen ekstrakt döner buharlaştırıcıda (Rotary evaporator), 30 °C veya 40 °C'de buharlaştırıldı ve 4 °C'de muhafaza edildi (Karakaya 2003).

3.2.2 Maya Suşunun Saklanması

Saccharomyces cerevisiae suşları öncelikle katı YPD besi yerine ekildi. Katı YPD besi yerinde gelişen hücreler, daha sonra agarın olmadığı sıvı YPD besi yerinde, çalkalayıcı yardımı ile 30°C'de, 200 rpm'de geliştirildi. Optik yoğunluğu 600 nm oluncaya kadar beklendi.

3.2.3 Comet Yöntemi ile DNA Hasarının ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

3.2.3.1 Maya hücrelerinde

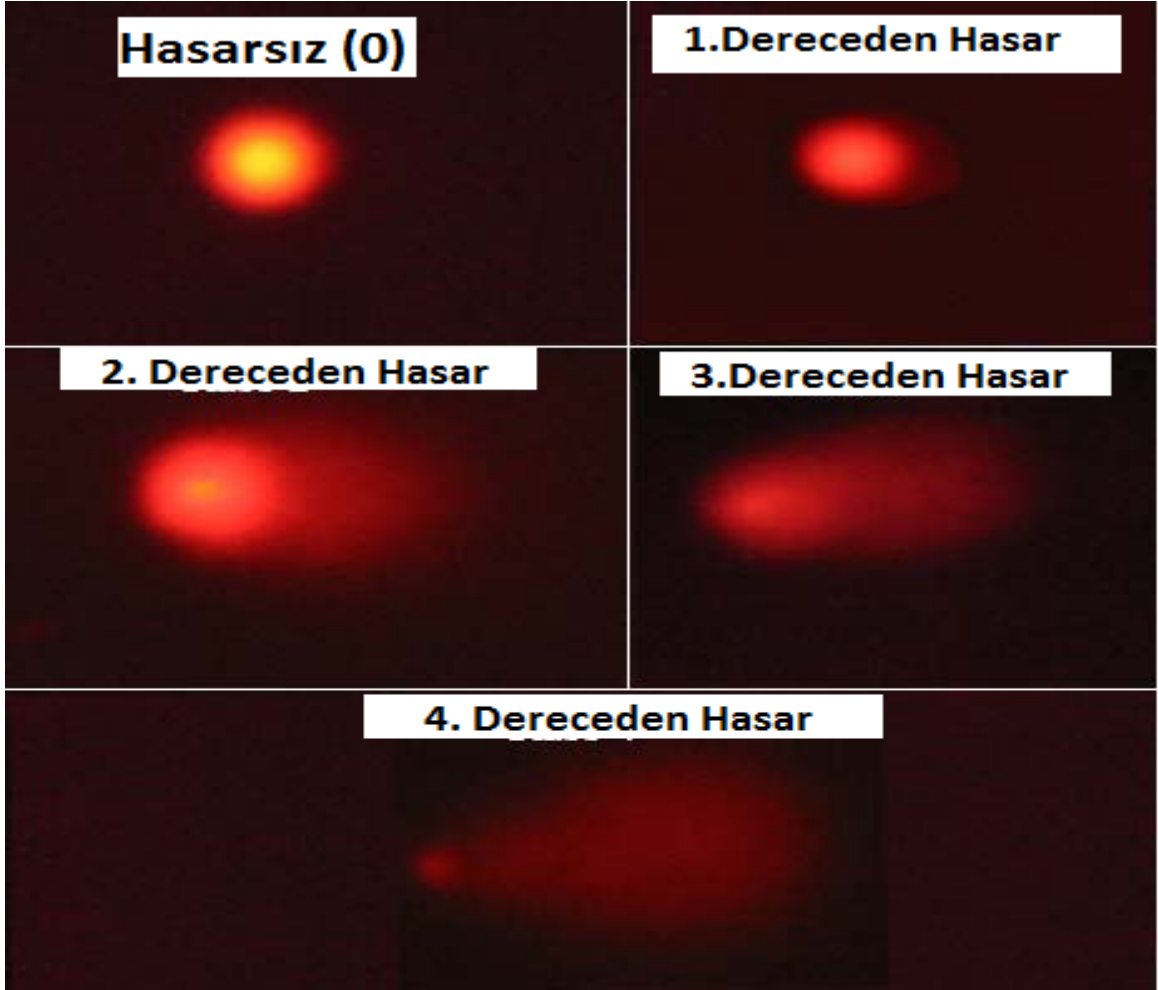
Stok kültürdeki *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinden 1 koloni alınarak 10 mL'lik sıvı YPD besiyerine aktarıldıktan sonra, 30 °C'de, 200 rpm'de, 1 gün inkübe edildi. Daha sonra uygun hacimde hücre, OD600'de 0,1 olacak şekilde, 25 mL'lik sıvı YPD besi yerine aktarıldı ve OD600'de 0,4 – 0,8 hücre oluncaya kadar, aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Uygun yoğunluğa gelen hücreler daha sonra, 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 15300 rpm'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet, 1 mL Litikaz tamponunda süspansiyon edildi. Sferoplastları elde etmek amacıyla 200 rpm'de, 30 °C'de, 30 dakika beklemeye bırakıldı. Daha sonra Litikaz tamponundaki sferoplastlar, kullanacağımız slayt sayısı kadar ependorf tüplerine, her tüpe 80 µL olacak şekilde paylaştırıldı ve 15300 rpm'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüj edildi. Pellet 80 µL, % 1,5 oranında LMA ile 35 °C'de süspansiyon edildi. Daha sonra bu karışım, önceden hazırlanmış, üzerlerine % 0,5 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). Daha sonra Sorbitol tamponu içinde çözdürdüğümüz *Chenopodium album* ekstresinden (0,4 mg/mL ve 2 mg/mL) belirlediğimiz slaytların üzerindeki jellere 80 µL yayıldı. Slaytlar lamellerle tekrar kapatılarak 30 °C'de 20 dakika beklemeye bırakıldı. 20 dakika sonunda, jeller katılaşması için buz kasetlerinin üstünde kısa bir süre bekletildi ve sonrasında lameller slaytlardan kaydırılarak alındı. Bir sonraki aşamada, pozitif kontrol olarak kullandığımız ve sadece oksidan solüsyonu içerecek olan slaytlar üzerine 300 µL H₂O₂ (10 mM) yayıldı. *Chenopodium album* ekstresinin uygulandığı slaytlara ise yine 300 µL H₂O₂ (5 mM) yayıldı. 20 dakika beklendikten sonra, jeller Sorbitol tamponu ile 5 dakika yıkandı ve Lizis solüsyonu içine alındı. 20 dakika sonra solüsyondan çıkarılan slaytlar elektroforez tamponu ile yıkandıktan sonra, yine bu tampon içinde 20 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda 10 dakika, 0,7 V/cm olacak şekilde ve minimal ışık altında yürütme işlemine geçildi. Daha sonra jeller 10mM Tris-HCl tamponunda, pH 7,4'te, 10 dakika bekletilerek nötralize edildi. Bu aşamanın ardından, örnekler, önce %76'lık sonra % 96'lık etanol ile 10 dakika fikse edildi. Laminal kabinde, 4°C'de kurumaya bırakılan slaytlar son olarak 60 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).

3.2.3.2 Lökosit hücrelerinde

Deneyde kullanılan insan lenfosit hücreleri sağlıklı gönüllülerden alınan kandan sağlandı. Bitki ekstresi ise PBS tamponu ile çözülerek farklı konsantrasyonlar elde edilerek hazırlandı. Steril koşullarda kan alma işleminden sonra aynı miktarda histopak ve kan, ependorf tüplerine alındı. Oda sıcaklığında 2000 rpm'de, 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan ve hücrelerin bulunduğu bulutsu kısım mikropipet ile çekildi. Bu kısım ayrı ependorf tüplerine alınarak üzerine eşit miktarda PBS tamponu eklendi. 2300 rpm'de, 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelere, hücre yoğunluğuna göre 500-1000 µL PBS eklendi ve homojen çözelti olması sağlandı (Negatif kontrol). Daha sonra ekstrakt uygulamasına geçildi. İki ayrı ependorf tüpüne, PBS tamponu içinde çözdürdüğümüz *Chenopodium album* ekstresinden (0,4 mg/mL ve 2 mg/mL) 200 µL aktarıldı. Üzerlerine 700 µL PBS ve 100 µL negatif kontrolden ilave edildi. Karışım 37 °C'de, 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre dolduktan sonra, hücreler 2500 rpm'de, 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelerin üzerine 475 µL PBS ve 25 µL H₂O₂ (5 mM) eklendi. Aynı süre zarfında Pozitif kontrolü hazırlamak için, başka bir ependorf tüpüne, 800 µL PBS, 100 µL H₂O₂ (10 mM) ve 100 µL negatif kontrolden eklendi. Ependorf tüpleri 5 dakika, 4 °C'de bekletildi. Sonrasında 2500 rpm'de, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Hücreler üzerine 500 µL PBS eklendi. Ardından tekrar 2500 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant atıldı. Sonrasında ayrı ependorflara negatif kontrol, pozitif kontrol ve bitki ekstraktlarının olduğu ependorflardan 20 µL alındı ve üzerine % 0,8'lik LMA eklenerek karıştırıldı. Karışım, önceden hazırladığımız, üzerlerine % 1'lik NMA yayılmış olan slaytlara 2. kat olarak yayıldı. Üzerleri lameller ile kapatılarak 2 dakika buz kasetleri üzerinde bekletildi. Lameller jellerin kaydırılarak alındı ve tüm slaytlar 1 saat Lizis tamponunda beklemeye alındı. 1 saat sonunda Lizis tamponundan alınan slaytlar elektroforez tamponunda 20 dakika beklemeye alındı. Bir sonraki işlem olan yürütme işlemi, 20 dakikada, 450 mA ve 20 V koşullarında gerçekleştirildi. Jeller 10mM Tris-HCl tamponunda, pH 7,4'te, 10 dakika bekletilerek nötralize edildi. Laminal kabinde, 4°C'de kurumaya bırakılan slaytlar son olarak 60 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 (Tokaç 2007).



Şekil 3.1 Meydana gelen DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altındaki görüntüleri

3.2.4 Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitelerin Araştırılması

Chenopodium album'un yapraklarından elde edilen ekstrelerden 0,1 g tartılıp 1 mL DMSO'da vortex ile karıştırılarak birinci stok çözelti, 0,01 g tartılıp 1 mL DMSO'da çözülerek ikinci stok çözelti, 0,0125 g tartılıp 1 mL DMSO'da çözülerek ise üçüncü

stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan ekstrelerin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420), *Bacillus subtilis* (NRS-744), *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* (ATCC 11778) bakterileri üzerine etkileri Disk Difüzyon Testi ile incelendi. Bakteri kültürleri 0,5 Mc Farland (McF) 'a gelinceye kadar 37°C 'de NB'da inkübasyona bırakıldı, 0,5 Mc Farland standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonları agar besiyeri bulunan petrilere ekildi. Ekim steril pamuklu silgiçler ile uygulandı. Pamuklu silgiç, bakteri kültürüne batırıldıktan sonra, sıvının fazlası silgicin tüp yüzeyine bastırılması ile akıtıldı ve plak yüzeyine sürülerek tüm yüzeye ekim yapıldı. Bakteri ekimi yapıldıktan sonra hazırlanan diskler besiyerinin yüzeyine yerleştirildi. Bu diskler üzerine birinci stok çözeltiden 5 ve 10 µL emdirilerek 50 ve 100 µg, ikinci stok çözeltiden 10, 5 ve 2,5 µL emdirilerek 250, 500 ve 1000 µg, üçüncü stok çözeltiden ise 10 µL emdirilerek 125 µg çalışıldı. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 37 °C'deki inkübatöre yerleştirildi. Gecelik inkübasyondan sonra oluşan zonların çapları mm olarak ölçüldü. Her bir ekstre için 3 tekrar yapıldı, belirtilen değerler bu ölçümlerin ortalamaları olarak alındı. Negatif kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol grubu olarak Amoksisislin-klavulonik asit (AMC30), Tetrasiklin (TE30), Cefotetan (CN10), Ampisilin (AMP10), Ofloksasin (OFX5), Teikoplanin (TEC30) kullanıldı (Collins *et al.* 1989, Bradshaw 1992, Dığrak *et al.* 1999).

3.2.5 Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerin Ölçülmesi

3.2.5.1 Total Oksidan Seviyesi (TOS)

C. album metanolik yaprak ekstresinin total oksidan seviyelerinin ölçülmesinde hazır kit kullanılmıştır (Rel Assay Diagnostic, RL0024). Kitin çalışma prensibi ise şu şekildedir:

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks

oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir (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)

Öncelikle standart çalışma solüsyonu hazırlanır. SSSS 40.000 kar deiyonize su ile dilüe edilir. 50 µL SSS 10 mL deiyonize suya ilave edilir ve vortekslenir. Hazırlanan solüsyondan 50 µL alınır tekrar 10 mL deiyonize suya eklenir. Son konsantrasyon olarak elimizde 20 µM H₂O₂ bulunur.

Bu aşamadan sonra örnekler sulandırılır. Boş tüplere 500 µL Reagent 1 koyularak üzerine de 75 µL örnek ilave edilir. Standart 1 olarak kullanılacak tüpe 500 µL Reagent 1 ve 75 µL deiyonize su eklenir. Standart 2 tüpüne ise 75 µL dilüe ettiğimiz H₂O₂'den ilave edilir. 530 nm'de ilk absorbanslarına bakılır. Daha sonra tüm örneklerin üzerlerine 25 µL Reagent 2 eklenerek 5 dakika, 37 °C'de bekletilerek ikinci absorbans değerleri ölçülür. Sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanır:

Total Oksidan Seviyesi (TOS): $(\Delta\text{Abs.örnek} / \Delta\text{Abs.standart2}) \times 20$

Δ : Abs.2-Abs.1

3.2.5.2 Total Antioksidan Seviye (TAS)

C. album metanolik yaprak ekstresinin total antioksidan seviyelerinin ölçülmesinde hazır kit kullanılmıştır (Rel Assay Diagnostic, RL0017). Kitin çalışma prensibi ise şu şekildedir:

ABTS radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak koyu mavi-yeşil renk oluşumu artırmaktadır. 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 bileşimler:

- Reagent 1 (Assay Bufer): 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

Öncelikle örnek tüplerine 500 µL Reagent 1 ve 30 µL örnek ilave edildi. Daha sonra Standart 1 tüpünün hazırlanması için boş bir tüpe 500 µL Reagent 1 ve 30 µL deiyonize su eklendi. Standart 2 tüpü ise aynı şekilde 500 µL Reagent 1’in üzerine 30 µL deiyonize su eklenmesi ile elde edildi. İlk spektrofotometrik okumalar 660 nm’de gerçekleştirildikten sonra tüm örnekler üzerine 75 µL Reagent 2 eklenir ve 5 dakika, 37 °C’de bekletilerek ikinci absorban değerleri ölçülür. Sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanır:

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

Δ : Abs.2-Abs.1

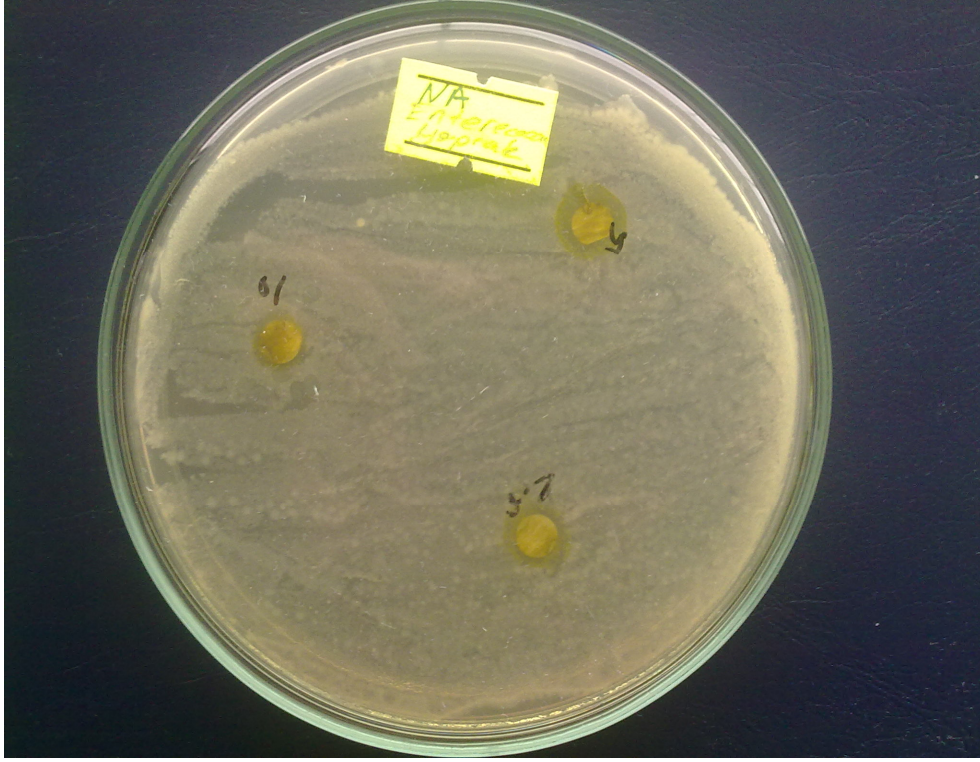
3.2.6 İstatistiksel Analizler

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) for Windows paket programı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), LSD testi kullanılmıştır.

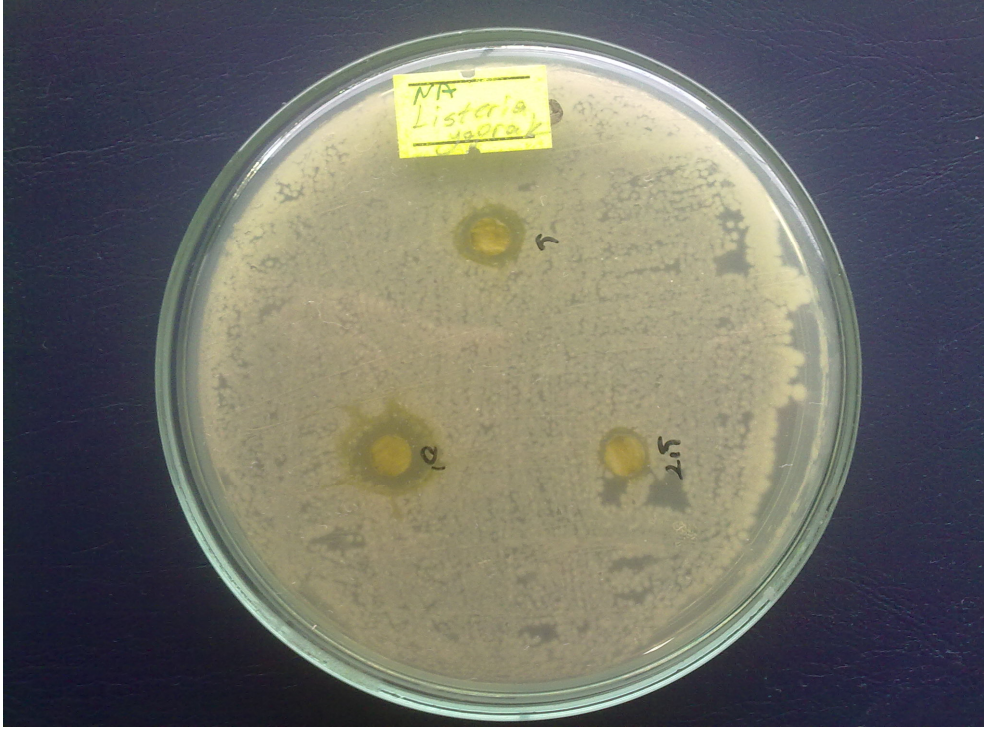
4. BULGULAR

4.1 Antimikrobiyal Aktivite

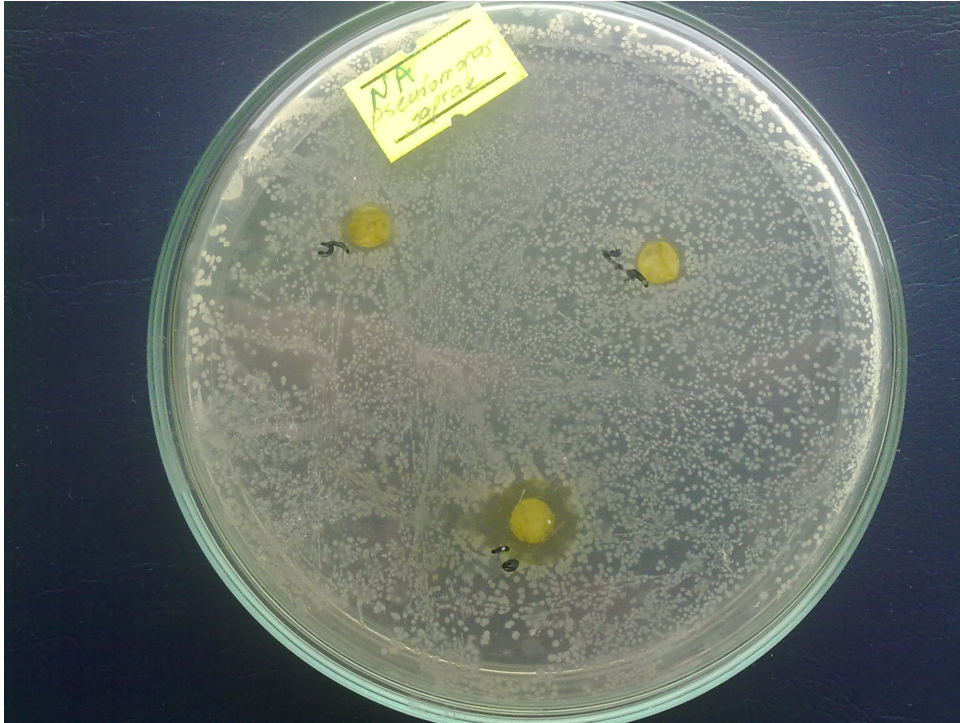
C. album bitkisinin metanolik yaprak ekstresinin antimikrobiyal etkileri Çizelge 4.1-2'de, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* ve *P. aeruginosa* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları Resim 4.1-2-3'de verilmiştir.



Resim 4.1 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin *E. fecalis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.



Resim 4.2 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin *L. monocytogenes* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları.



Resim 4.3 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin *P. aeruginosa* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları

Çizelge 4.1 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin ($\mu\text{g/mL}$) gram negatif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etki sonuçları

	DMSO	AMC	TE	OFX	50 μg	100 μg	125 μg	250 μg	500 μg	1000 μg
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	30	25	35	-	-	8	9	10	12
<i>S. typhimurium</i> (NRRLB-4420)	-	33	26	38	7	7	8	9	9	11
<i>P. vulgaris</i> (ATCC 7644)	-	23	22	35	7	8	9	9	11	12
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 11778)	-	*	*	*	7	8	8	9	9	12

DMSO: Dimetil sülfoksit, AMC 30: Amoksisislin-klavulonik asit, TE 30: Tetrasiklin, OFX 5: Oflaksasin, *: Belirlenemedi, İnhibisyon zonları (mm)

Çizelge 4.2 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin ($\mu\text{g/mL}$) gram pozitif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etki sonuçları

	DMSO	CN	AMP	TEC	50 μg	100 μg	125 μg	250 μg	500 μg	1000 μg
<i>M. luteus</i> (ATCC 7644)	-	15	13	10	7	7	9	9	9	9
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	-	15	13	21	7	7	8	8	10	11
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	-	17	-	-	7	8	8	10	11	12
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	-	12	13	24	-	-	8	9	10	10
<i>B. subtilis</i> (NRS-744)	-	28	28	22	7	8	8	10	10	13

DMSO: Dimetil sülfoksit, CN 10: Cefotetan, AMP 10: Ampisilin, TEC 30: Teikoplanin, İnhibisyon zonları (mm)

C. album yaprak ekstralarının gerek gram negatif, gerekse gram pozitif bakteriler üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Yaprak ekstraları en fazla antimikrobiyal etkiyi denenen en yüksek doz olan 1000 µg/mL’de göstermiştir. 1000 µg/mL da en fazla etki *B. subtilis*’te (13 mm), en düşük etki ise *M. luteus*’da (9 mm) bulunmuştur.

50 ve 100 µg/mL’de, ekstraktların; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia* ve *E. faecalis* üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır.

B. cereus’un, AMP ve TEC’e karşı dirençli olmamasına rağmen ekstraktların denenen tüm konsantrasyonlarına duyarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1 ve 4.2).

4.2 Total Oksidan ve Antioksidan Seviye (TOS ve TAS)

Çizelge 4.3 *C. album* metanolik yaprak ekstresinde total oksidan, antioksidan seviyelerin ve oksidatif stres indeksinin sonuçları.

	TAS	TOS
CYE 0,4 mg/mL	1,051	20,0
CYE 2 mg/mL	1,301	15,2

CYE: *C. album* yaprak ekstresi, TAS: Total antioksidan seviye, TOS: Total oksidan seviye

Çalışmamızda *C. album* yaprak ekstresinin konsantrasyona bağlı olarak TAS kapasitesinin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.3).

4.3 Comet Yöntemi

4.3.1 Maya Hücrelerinde

C. album yaprak ekstralarının 0,4 mg/mL ve 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarının H₂O₂ ile indüklenmiş maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı etkisi araştırılmıştır. Pozitif kontroldeki hasar ortalama $165,3 \pm 8,4$ olarak saptanmıştır. Bu değer denenen diğer tüm uygulamalar için farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Yaprak ekstraktları ile birlikte H₂O₂ in uygulandığı örneklerde (YE-0,4 mg/mL +H₂O₂ ve YE-2 mg/mL +H₂O₂) oluşan DNA hasarı, sadece yaprak ekstraktı uygulanan slaytlara göre (YE-0,4 mg/mL ve YE-2 mg/mL) daha fazla bulunmuştur *C. album* yaprak ekstralarının gerek 0,4 mg/mL gerekse 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarının, H₂O₂ ile birlikte uygulandığı slaytlardaki DNA hasarı pozitif kontrole göre daha düşük olup bu durum *C. album* yaprak ekstralarının, H₂O₂' nin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı genetik hasara karşı koruyucu rol oynadığını göstermektedir (Çizelge 4.5) (Resim 4.4).

4.3.3 Lökosit Hücrelerinde

H₂O₂ ile indüklenmiş lökosit hücrelerinde yapılan DNA hasar çalışmasının sonucu pozitif kontrolde hasar düzeyi ortalama $58,0 \pm 2,6$ olarak saptanmıştır. Yaprak ekstralarının 0,4 mg/mL'lik konsantrasyonunda hasar ortalama $41,0 \pm 10$ iken, 2 mg/mL'lik konsantrasyonda ise ortalama $20,3 \pm 1,5$ olarak bulunmuştur. Ekstraktların konsantrasyonları arttıkça oluşan hasarın azaldığı gözlemlenmiştir. H₂O₂ uygulanmış olan yaprak ekstralarında hasarın (YE-0,4+H₂O₂ ve YE-2+H₂O₂) pozitif kontrole göre daha düşük, H₂O₂ ile indüklenmemiş yaprak ekstralarına (YE-0,4 ve YE-2) göre ise daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4) (Resim 4.5).

Gerek lökosit gerekse maya ile yapılan DNA hasar çalışmaları, *C. album* yaprak ekstralarının oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı korunmada rolü olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin H₂O₂ ile indüklenen lökosit hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı direnci

	N	Ortalama + SD	NK	PK	YE-0,4	YE-0,4+H ₂ O ₂	YE-2	YE-2+H ₂ O ₂
NK	3	9,6 ± 4,7	-	1	1	1	0	1
PK	3	58,0 ± 2,6	1	-	1	0	1	1
YE-0,4	3	41,0 ± 10	1	1	-	1	1	1
YE-0,4+H ₂ O ₂	3	54,0 ± 10	1	0	1	-	1	1
YE-2	3	20,3 ± 1,5	0	1	1	1	-	0
YE-2+H ₂ O ₂	3	27,3 ± 2,5	1	1	1	1	0	-

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, YE: Yaprak ekstraktı (mg/mL), N: Tekrar sayısı, SD: Standart sapma

1: Farklı (p < 0,05)

0: Benzer (p > 0,05)

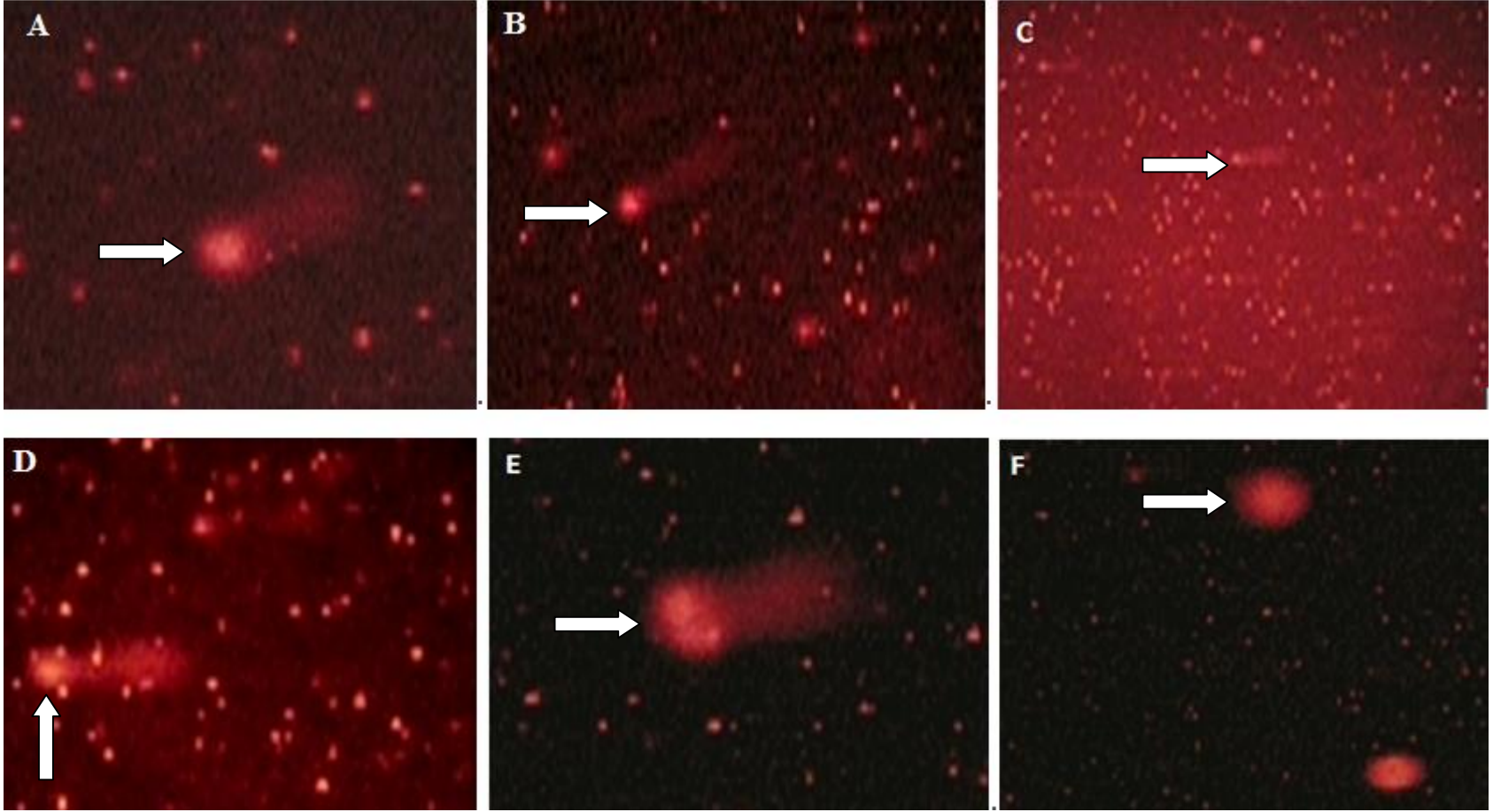
Çizelge 4.5 *C. album* metanolik yaprak ekstresinin H₂O₂ ile indüklenen maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına (AU) karşı direnci

	N	Ortalama + SD	NK	PK	YE-0,4	YE-0,4+H ₂ O ₂	YE-2	YE-2+H ₂ O ₂
NK	3	106,0 ± 12,3	-	1	1	0	1	0
PK	3	165,3 ± 8,4	1	-	1	1	1	1
YE-0,4	3	87,67 ± 3,8	1	1	-	1	0	1
YE-0,4+H ₂ O ₂	3	114,70 ± 8,3	0	1	1	-	1	0
YE-2	3	87,30 ± 8,3	1	1	0	1	-	1
YE-2+H ₂ O ₂	3	112,0 ± 7,2	0	1	1	0	1	-

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, YE: Yaprak ekstraktı (mg/mL), N: Tekrar sayısı, SD: Standart sapma

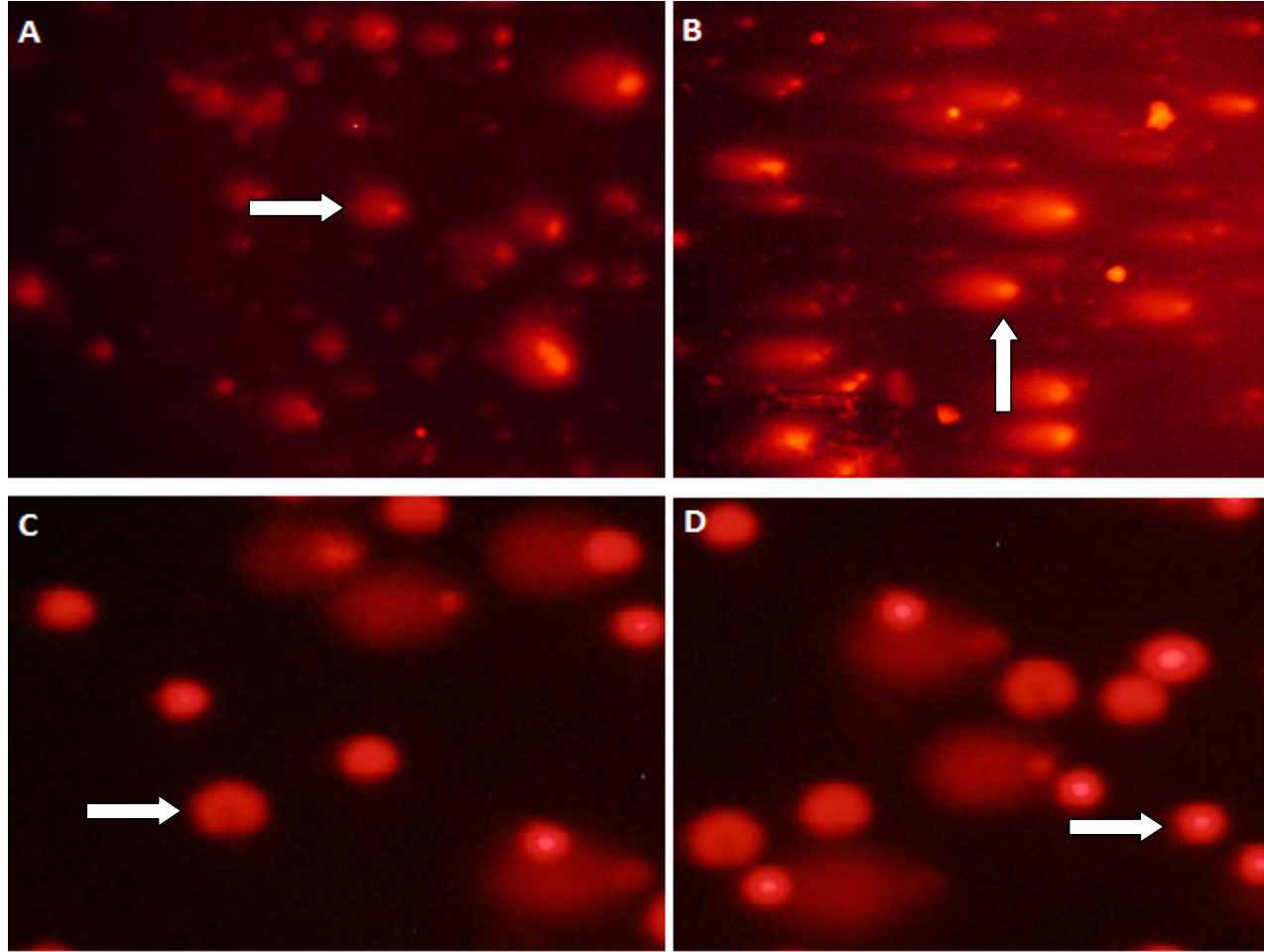
1: Farklı (p < 0,05)

0: Benzer (p > 0,05)



Resim 4.4 Etidyum Bromid ile Boyanmış Maya DNA'larının floresan mikroskop görüntüsü.

A ve E: 3. Dereceden hasarlı maya hücreleri (YE-0,4+H₂O₂ ve YE-2+H₂O₂). B, C ve D: 4. Dereceden hasarlı maya hücreleri (Pozitif kontrol). F: Hasarsız maya hücreleri (Negatif kontrol).



Resim 4.5 Etidyum Bromid ile Boyanmış Lökosit DNA'larının floresan mikroskop görüntüsü

A: 1.Dereceden hasarlı lökosit hücreleri (YE-2+H₂O₂). B: 3. Dereceden hasarlı lökosit hücreleri (Pozitif kontrol). C: Hasarsız lökosit hücreleri (Negatif kontrol). D: 2.Dereceden hasarlı lökosit hücreleri (YE-0,4+H₂O₂)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde bitkiler doğal ilaç hammaddelerinin vazgeçilmez kaynaklarıdır. Bu bileşiklerin antialarjik, antioksidan, antiülserojenik, antiviral, antimikrobial, hipoprotektif vb. özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Son on yılda antimikrobiyal etki gösteren bitki ürünleri mikroorganizmalara olan etkileri nedeniyle büyük ilgi kazanmışlardır. Bunun sebebinin; özellikle yiyeceklere eklenen sentetik maddelerin sağlığa zararlı olan etkisi olarak görülmektedir. Ayrıca bilinen tüm antibiyotiklere, direnç geliştirmekte olan bakterilerde, ilaç dirençliliği artmakta ve yayılmaktadır. Son yıllarda ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmektedir ve bazı geleneksel bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır (Abascal and Yarnell 2002).

Chenopodium halofilik bir bitki olması nedeni ile zor koşullara dayanıklı olup (Zeybek ve Zeybek 1994) özellikle kurak yerlerde, azot ve potasyum bakımından zengin topraklarda yayılış göstermektedir. Esansiyel yağları başta olmak üzere değişik çözücülerden elde edilen ekstraktları antimikrobiyal etkiye sahiptir (Akman vd. 2007). Bitkinin yetiştiği coğrafik konum ve iklim koşulları bitkinin esansiyel yağ kompozisyonu üzerinde etkilidir (Lahlou 2004).

C. album üzerine yapılan çalışmalarda bu bitkinin; antifungal (Tahara *et al.* 1994), antipruritik, antinosiseptif (Dai *et al.* 2002), hipotansiyon (Gohar and Elmazar 1997) gibi birçok etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Dembitsky *et al* (2008) Akdeniz’de yetişen *C. album* türlerinden elde edilen esansiyel yağlar üzerinde yapıtları araştırmada, bu yağların içeriğinde limonen (23,2 %), α -terpinil asetat (13,7 %), α -terpinen (12,3 %) ve cis-askaridol (12,2 %) olduğunu tespit etmişlerdir

C. album’un esansiyel yağları üzerine yapılan başka bir çalışmada ise bu yağların içeriğinin % 60,1’inin aromatik bileşiklerden oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca en çok bulunan bileşikler p- simen (40,9 %), askaridol (15,5 %), pinen-2-ol (9,9 %), α -pinen (7,0 %), β -pinen (6,2 %) ve α -terpineoldir (6,2 %) (Umsan *et al.* 2010).

Karakaya'nın (2003) *C. album*'daki bu esansiyel yağlarının 10 ve 25 µL'lik konsantrasyonlarının, *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu bulmuştur.

Çalışmamızda *C. album* metanolik yaprak ekstresinin gerek gram negatif, gerekse gram pozitif bakteriler üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Yaprak ekstraktları en fazla antimikrobiyal etkiyi, denenen en yüksek doz olan 1000 µg/mL'de göstermiştir. 1000 µg/mL da en fazla etki *B. subtilis*'te (13 mm), en düşük etki ise *M. Luteus*'da (9 mm) bulunmuştur. 50 ve 100 µg/mL'de, ekstraktların; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Yersinia* ve *E. faecalis* üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır. *B. cereus*'un, AMP ve TEC'e karşı dirençli olmamasına rağmen ekstraktların denenen tüm konsantrasyonlarına duyarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1 ve 4.2).

C. album'a ait, eter, etil asetat ve metanolden elde edilmiş ekstraktlar ile yapılan bir başka çalışmada ise bu ekstraktların; (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (17,3 mm), *Bacillus subtilis* UC 564 (19,7mm), *Bacillus polymexia* 474 (18,3mm), *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 (16,7mm), *Pseudomonas aeruginosa* 25619 (17,7mm), *Salmonella typhi* 57 (16,7mm), *Vibrio cholerae* 824 (17,3mm) and *Shigella dysenteriae* (17,3mm) *Escherichia coli* NCTC 8196 (18 mm) , *Penicillium notatum* ATCC 11625(15 mm), *Aspergillus niger* AB 41 (16,3), *Candida albicans* ATCC 18804(18,3 mm) suşları üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Nayak *et al.* 2010)

Neerja *et al.* (2007) *C. ambrosioides*'in aerial kısımlarının sulu ve aseton ekstraktlarının *Mycobacterium tuberculosis* (CCKO28469V) üzerine antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu saptanmıştır. *C. amaranticolor*'un yaprak ekstraktlarının *Tobacco mosaic* virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği gözlemlenmiştir. *C. quinoa* tohumlarından elde edilen saponinlerin *Candida Albicans*'ın (ATCC 10231) büyümesini engelleyici etki gösterdiği belirtilmiştir. *C. botrys* esansiyel yağları ile yapılan antimikrobiyal aktivite deneyinde ise bu yağların; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Candida*

albicans (ATCC 10259), *Sarcina lutea* (ATCC 9341), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665), *Salmonella enteridis* (ATCC 13076) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) üzerine etkili olduğu saptanmıştır

Çalışmamızdan elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen verilere benzerlik göstermektedir (Karakaya2003, Nayak *et al.* 2010, Neerja *et al.* 2007). İnhibisyon zonlarının düşük olmasının nedeni esansiyel yağ asidi ekstraktlarının yerine metanol ekstraktlarını kullanmamızdan kaynaklanmaktadır.

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında biyolojik etkilerinden dolayı en önemli bileşik sınıflarından birisi flavonoidlerdir. Bunlar bitkilerin tüm organlarında mevcuttur. Bitkilerden 4000'den fazla flavonoid elde edilmiş olmasına rağmen flavonoid içeriği bakımından on binlerce bitki türü henüz incelenmemiştir. Türkiye florasının zenginliği ve araştırmaların az sayıda olması flavonoidlere karşı ilgiyi arttırmaktadır. Flavonoidler bitkilerde enerji dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki etmesinin yanında solunum, fotosentez düzenleme ve hastalıklara karşı koruma fonksiyonları da vardır. Ayrıca eritrosit oluşumunu teşvik eder ve lökosit miktarını arttırmaları. Fitokimyasallar bakımından *C. album* bitkisi araştırılmış ve alkaloidlere (Horio *et al.* 1993, Cutillo *et al.* 2004), apokarotenoidlere (DellaGreca *et al.* 2004), flavonoidlere (Gohar and Elmazar 1997), Fitoekdisteroitler (Dinan 1992; Dinan *et al.* 1998, DellaGreca *et al.* 2005) rastlanmıştır.

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri; redüksiyon ajanları olarak görev alması gibi redoks özelliklerinden, hidrojen donörü olarak etki göstermesinden, singlet oksijen baskılayıcı özelliğinden ve metal şelatlayıcı potansiyelinden kaynaklanabilmektedir. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, μ -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur. Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik

gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur (Burak ve Çimen 1999). Nahar ve Serker (2005) yaptığı araştırmalarda, *C. album*'un tohumlarından elde ettikleri metanol ekstrelerinde yeni bir fenolik glikozid olan chenoalbuside'i keşfetmişlerdir.

Pal *et al.* (2011) eter ekstraktlarını kullandığı *C. album* bitkisinde alkaloid ve flavonoidlere rastlamıştır. Ayrıca aseton:metanol (50:50) ekstraktlarında ise, başta flavonoidler olmak üzere alkaloidlere, saponinlere, tanin, quercetin, kaempferol ve fenolik bileşiklere rastlamıştır.

Antioksidan ve serbest radikalleri süpürücü etkilerinin (DPPH) çalışıldığı bir başka araştırmada ise *C. album*'un 2500 µg/mL'de, sulu ekstrelerinin % 86,42, metanol ekstrelerinin ise %89,15 oranında DPPH etkisi gösterdiği saptanmıştır. Yaprak ekstrelerinin % 0,94 total fenolik içeriğe sahip olduğu, antioksidan etkilerinin bu fenolik bileşiklerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. *C. album* bitki ekstraktları redüktan kapasiteye sahiptir. Redüktanlar serbest radikal zincirlerin terminatörleridir. Bu sebeple antioksidan aktivite ile doğrudan ilişkilidir (Kumar and Kumar 2009).

Çalışmamızda TAS değerlerine bakıldığında CYE 2 mg/mL'nin CYE 0,4 mg/mL'a göre daha fazla antioksidan olduğu görülmüştür (TAS-CYE 0,4 mg/mL: 1,051 ve TAS-CYE 2 mg/mL: 1,301). *C. album* yaprak ekstresinin konsantrasyona bağlı olarak antioksidan kapasitesinin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.3). Bu veriler DNA hasar deneylerinden elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Serbest radikaller vücutta gerçekleşen her işlemden, her aşamada doğal olarak meydana gelmektedir. Fakat normalde vücuttaki doğal antioksidan savunma sistemleriyle bu kararsız elektron yüklü kimyasallar büyük oranda yok edilmekte ya da uzaklaştırılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi yeterince iyi çalışmıyorsa ve antioksidan gıdalar yeterli oranda yenilmiyorsa veya antioksidan özellikli desteklerden faydalanılmıyorsa serbest radikaller hücrelere zarar vererek birçok önemli rahatsızlığın başlangıcına zemin hazırlar ve de erken yaşlanmaya sebebiyet verir.

Serbest radikaller vücudun antioksidan aktivitesinden daha yoğunsa olduklarında bir dengesizlik meydana gelir ve hücrelerde oksidatif hasar oluşur.

Vücutta oksidatif hasar çeşitli tip oksijen radikallerince oluşturulmakta ve her antioksidan bu radikal tipleri üzerinde etkili olamamaktadır. Bu yüzden daha yüksek ölçekte bir fayda sağlamak için mümkün olduğunca değişik antioksidant kaynaklarından faydalanılması gerekir (Kim *et al* 2003).

C. album yaprak ekstrelerinin 0,4 mg/mL ve 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarının H₂O₂ ile indüklenmiş maya hücrelerinde oluşan DNA hasarına karşı etkisi araştırılmıştır ve pozitif kontroldeki hasar diğer tüm uygulamalar için farklı bulunmuştur (p < 0,05). Yaprak ekstraktları ile birlikte H₂O₂ in uygulandığı örneklerde oluşan DNA hasarı, sadece yaprak ekstraktı uygulanan slaytlara göre daha fazla olmuştur *C. album* yaprak ekstrelerinin gerek 0,4 mg/mL gerekse 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarının, H₂O₂ ile birlikte uygulandığı slaytlardaki DNA hasarı pozitif kontrole göre daha düşük olup bu durum *C. album* yaprak ekstrelerinin H₂O₂ in neden olduğu oksidatif hasara karşı DNA'yı korunmasında rol oynadığını göstermiştir (Çizelge 4.5) (Resim 4.4).

H₂O₂ ile indüklenmiş lökosit hücrelerinde yapılan DNA hasarı çalışmasının sonucu ekstraktların konsantrasyonları arttıkça oluşan hasarın azaldığı gözlemlenmiştir. H₂O₂ uygulanmış olan yaprak ekstrelerindeki hasarın pozitif kontrole göre daha düşük, H₂O₂ ile indüklenmemiş yaprak ekstrelerine göre ise daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4) (Resim 4.5).

Saccharomyces cerevisiae hücrelerine Comet yöntemini uygulamak pek çok avantajı birlikte getirmektedir. Gerek çabuk gelişen bir organizma olmasından, gerekse kültürünün ucuz ve kolay elde edilebilir olmasından dolayı bu organizma tercih edilmektedir. Günümüzde, dünya genelinde alınan önleyici kararlar ile birçok hayvanın kimyasal deneylerde kullanılmasına kısıtlama getirilmektedir (Rank *et al.* 2009). Bu sebepten dolayı, *Saccharomyces cerevisiae* bu problemin çözümü olabilir. Çünkü yüksek ökaryotlar ile mayalar, transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve DNA onarım mekanizmaları bakımından benzerlik gösterirler. İnsanlarda çeşitli hastalıklarla ilgili olan genlerin yaklaşık %30'u maya genleri ile eşleşmekte, insan hücrelerinin tersine,

maya genleri moleküler biyoloji teknikleri ile kolayca manipüle edilmektedir (Silva *et al.* 2005).

Gerek lökosit gerekse maya hücreleri ile yapılan DNA hasar çalışmalarımız, *C. album* yaprak ekstrelerinin DNA hasarına karşı korunmada etkili bir role sahip olduğunu göstermektedir. Muhtamelen fenolik bileşikler bu etkide rol oynamaktadır. Bu nedenle, *C. album* ile yapılacak gelecekteki çalışmalar bu bitkinin antioksidan bileşiklerinin izolasyonu ve tanımlanması üzerine yoğunlaşmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abascal, K., Yarnell, E. (2002). Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes. *Alternative and Complementary Therapies*. **1**, 237-241.
- Achary, V. M. M., Jena, S., Panda, K. K. and Panda, B. B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 300–310
- Akgül A, Kıvanç M. (1989). Sensitivity four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs, and citrus peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **47**: 129-132.
- Akgül A. (1993). Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Tenolojisi Derneği Yayınları No: 15, 451ss, Ankara.
- Akman Y, Güney K, Ketenoğlu O, Hamzaoğlu E, Kurt L, Tuğ NG. (2007). *Angiospermae*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Altuntaş İ. (2007). Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Alzokery NS, Nakahara K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, **80**:223-230.
- Amundson SA, Patterson A, Do KT, Fornace AJ Jr., (2002). A nucleotide excision repair master switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes, *Cancer Biol Ther*. Mar-Apr; **1(2)**:145-9.

- Anita Pal, Bhaskar Banerjee, Tanushree Banerjee, Manisha Masih, Kailash Pal. (2011). Hepatoprotective Activity of *Chenopodium Album Linn.* Plant Against Paracetamolinduced Hepatic Injury in Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491, **3**: 55-57
- Asayama, K. and Kato, K. (1990). Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radical Biology & Medicine*, **8**, 293-303.
- Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, et al. (2000). Alterations of the DNA Repair Gene OGG1 in Human Clear Cell Carcinomas of the Kidney. *Cancer Research*; **60**: 4740– 4744.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J., (2003). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*, **66** (4), 668-673.
- Baydar H. (2005). Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları No: 51 (ISBN975-7929-79-4) 221 s, Isparta.
- Bianchi, G., Solaroli, E., Zaccheroni, V., Grossi, G., Bargossi, A.M., Melchionda, N. and Marchesini, G. (1999). Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: Effect of treatment. *Hormone and Metabolic Research*, **31**, 620-624.
- Boiteux S, Radicella JP. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*; **81**(1-2): 59-67.
- Bootsma D, Hoeijmakers JH., (1993). DNA repair, Engagement with transcription, *Nature*, May 13;**363**(6425):114-5.
- Bradshaw, L.J. (1992). ‘Laboratory of Microbiology’, 4th edn. pp. 435. USA. Saunders College Publishing, Printed in USA.

- Brent JA, Rumack HH. (1993). Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology* ; **49**(4): 481– 93.
- Brumer Y, Shakhnovich EI., (2004). Importance of DNA repair in tumor suppression, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* Dec;**70**(6 Pt 1):061912.
- Brzezinski A. (1997). Melatonin in humans. *N Engl J Med*;**336**(3):186-95.
- Burak M. Çimen Y. (1999). Flavonoidler Ve Antioksidan Özellikleri Türkiye Klinikleri *J Med Sci* **19**:296-304
- Burçak G, (2004). Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med*; **35**: 159-169.
- Burton G, Traber M. (1989). Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr*; **119**(6):109-11.
- Burton G, Traber M. (1990). Vitamin E: antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *J. Annu. Rev. Nutr*; **10**: 357–82.
- Canbas A. (1983). Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78, Ç. Ü. Adana.
- Caporaso N. (2003). The Molecular Epidemiology of Oxidative Damage to DNA and Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*; **95**(17): 1263-1265.
- Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon M, Oudard S, et al. (1998). Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*; **16**: 3083-3086.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, and J.M. (1989). ‘‘Microbiological Methods’’, 6th edn, pp. 410. Butterworths, London.

- Collins AR. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioEssays*; **21**: 238–246.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J*; **17**: 1195- 1214.
- Cros CE, Halliwell B, Borish ET. (1987). Oxygen radicals and human disease. *J. Annals. int. Med* ;**107**(6): 526 – 545.
- Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Zarrelli A. (2004). Chenoalbicin, a novel cinnamic acid amide alkaloid from *Chenopodium album*. *Chemistry and Biodiversity*; **1**: 1529-1583.
- Davidson, P.M. and Parish, M.E., (1989). Methods of testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 148-155.
- Davidson, P.M. and Naidu, E.S., (2000). Phyto-Antimicrobials in *Natural Food Antimicrobial Systems*, Eds. Naidu A.S., CRC Press, (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Davis, P.H., (1982). Flora of Turkey and the East Eagen Islands, **2**, *Edinburgh University Press*, Edinburgh.
- Debeleş B, Bütüner B, Kantarcı G. (2006). Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları Ve Kanserle İlişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg*; **35** (2) 149 - 170
- DellaGreca M, Di Mariono C, Zarrelli A, D'Abrosca B. (2004). Isolation and phytotoxicity of apocarotenoids from *Chenopodium album*. *J Nat Prod*; **67**:1492-1495.

- DellaGreca M, D'Abrosca B, Fiorentino A, Previtera L, Zarrelli A. (2005). Structure elucidation and phytotoxicity of ecdysteroids from *Chenopodium album*. *Chemistry and Biodiversity*; **2**:457-62.
- Demain, A. L., (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **52**, 455-463.
- Dembitsky V, Shkrob I, Hanus LO. (2008). Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomed Pap Med*; **152**: 209-215.
- Dikilitas, M., Kocyigit, A. ve Yigit, 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.
- Dinan L. (1992). The analysis of phytoecdysteroids in single (preflowering stage) specimens of fat hen, *Chenopodium album*. *Phytochem Anal*; **3**:132-138.
- Dinan L, Whiting P, Scott AJ. (1998). Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the *chenopodiaceae*. *Biochem Syst Ecol*; **26**:553-576.
- Dinçer Y, Akçay T. (2000). DNA hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*; **25**(2): 73-79.
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free radical Biology & Medicine*, **10**, 225-242.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanism and measurement. *Free Radic Biol Med*, **32** (11): 1102-1115.
- Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H. (1999). "Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*", *Phytotherapy Research*, **13**, pp.584-587.

- Dorman HJD, Deans SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 308-316
- Drevet, J (2006). "The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story". *Molecular and Cellular Endocrinology* **250** (1–2): 70–9.
- Duarte TL, Lunec J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res*; **39**(7): 671-86.
- Durga Prasana Nayak, Pramod Kumar Swain, Om Prakash Panda, Pritosh pattanaik, B.Srinivas. (2010). *International Journal of Pharma World Research*, **1**: 1-15.
- Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot*, **64**: 1019- 1024
- Floyd, R.A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**; 9, 1447-1450.
- Friedberg EC. (1984). DNA Repair, s:1-2. *Freeman WH and Company*, New York.
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E., (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *J Biol Chem*. Apr **19**;271(16):9573-9578.
- Geoffrey M. Cooper, Robert E. (2006). *Hücre Moleküler Yaklaşım*. Türkçe çeviri. **3**: 192-230.

- Gichner, T. ve Plewa, M.J. (1998). Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, **401**:143-152
- Gichner, T., Znidar, I. ve Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in *tobacco* plants. *Mutation Research*, **652**:186-190.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D. ve 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.
- Gimisis T, Cismas C. (2006). Isolation, Characterization, and Independent Synthesis of Guanine Oxidation Products. *Eur. J. Org. Chem*; 1351- 1378.
- Gohar AA, Elmazar MMA. (1997). Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytother Res*; **11**:564-567.
- Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Gelbart W, Suzuki D, Miller J. (2005). Introduction to Genetic Analysis. 8th Edition, Chapter 14: Mutation, W.H. Freeman & Company.
- 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): 259-264.
- Halliwell B. (1989). Tell me about free radicals, doctora review. *Journal of the Royal Society of Medicine*; **82**: 747-752.

- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P., (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology*, **15**, 367-378.
- Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B et al. (2005). Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr*; **81**(4):736-45.
- Hernandez , N.E., Tereschuk , M.L., Abdala , L.R .(2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina), *Journal of Ethnopharmacology*, **73**:317-322 .
- Horio T, Yoshida K, Kikuchi H, Kawabata J, Mizutani J. (1993). A phenolicamide from roots of *Chenopodium album*. *Phytochemistry*; **33**:807-8.
- Hu J, Imam SZ, Hashiguchi K, Souza-Pinto NC, Bohr VA. (2005). Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (a-OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Research* ; **33**(10): 3271–3282.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Research*; **24**(8): 1389–1394.
- Kim J, Park YJ, Kim KH, Kim J II, Song BJ, Lee MS, Kim CN, Chang SH. (2003). hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol*; **9**(5): 956-960.
- Kim, H.O., Park, S.W., Park, H.D., (2004). Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology*, **21**, 105-110.
- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral G., Helvacı, S., (1992). “Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji”, Onur Yayıncılık pp.90-91.

- Klunglanda A, Bjellandb S. (2007). Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. *DNA Repair*; **6**: 481–488.
- Kumar S and D Kumar. (2009). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Edible Weeds. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. **9**: 1174-1190
- Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*; **18**:435–448.
- Lambert, R.J.W. and Pearson, J., (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 784-790.
- Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR. (2002). Association of the hOGG1 Ser326Cys Polymorphism with Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; **11**: 409-412.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, **19**:596-602.
- Loft S, Moller P. (2006). Oxidative DNA Damage and Human Cancer: Need for Cohort Studies. *Antioxid. Redox Signal*; **8**: 1021–1031.
- Lopez-Torres, M., Romero, M. and Barja, G. (2000). Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **168**, 127-134.
- Maksimovic ZA, Dordevic S, Mraovic M. (2005). Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil. *Fitoterapia*. **76**: 112-114

- Mann, C.M. and Markham, J.L., (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 538-544.
- Marino M, Bersani C, Comi G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J.Food Prot.*, **62**: 1017-1023.
- Marwan, A. G. and Nagel, C.W., (1986). Quantitative determination of infinite inhibition concentration of antimicrobial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, **51** (3): 559-561.
- Marques F. (2009). Evaluation of prevention of DNA damage and induction of DNA repair by natural compounds, Minho University, M.Sc Thesis: 27p.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Breese JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis*, **5**: 607-625.
- Mercan U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *YYU Vet Fak Derg*; **15** (1-2): 91-96.
- Montoya-Cabrera, M.A., Escalante-Galindo, P., Meckes-Fisher, M., Sanchez-Vaca, G., Flores-Alvarez, E., Reynoso-Garcia, M. (1996). Fatal poisoning caused by oil of epazote, *Chenopodium graveolens*. *Gaceta Medica de Mexico*, **132**, 433-437.
- Nahar L., Sarker S. D.. (2005). Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae). *Revista Brasileira de*

Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy Received. Accepted,
15(4): 279-282

Nasar-Abbas, S.M. and Halkman, K., (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac on the growth of some food borne bacteris including pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 63-69.

Neerja Yadav, Neeru Vasudeva, Sumitra Singh and Surendra K Sharma. (2007). Medicinal properties of genus *Chenopodium* Linn. *Natural Product Radiance*, **6(2): 131-134**

Negi, P.S., Jayaprakasha, L., Jagan Mohan Rao, L. and Sakariah, K.K., (1999). Antibacterial activity of turmeric oil: A byproduct from curcumin manufacture, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 4297-4300.

Nychas, G.J.E. and Skandamis, P.N., (2003). Antimicrobials from herbs and spices in *Natural Antimicrobials for Minimal Processing of Foods*, Ch 9, Eds. Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N & Tassou, C.C., CRC Press (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)

O'Gara E, Hill DJ, Maslin DJ. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbio.*, **66**: 2269-2273.

Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J. (2003). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **8(3): 207**.

Orren DK, Sancar A. (1987) New discoveries in the enzymology of DNA repair. *Cancer Rev* **7**: 5-27.

Özcan , S., Gemici ,Y., Leblebici , E., Gök , G., Bekät , L.,(1992). Tohumlu Bitkiler

Sistematiği, Ege Üniv.No.116 , Üçüncü Baskı, İzmir.

Rangan U, Bulkley GB. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull*; **49**(3):700-718.

Rank, J., K. Syberg, and K. Jensen. (2009). *Comet assay on tetraploid yeast cells. Mutat Res*, **673**(1): 53-58.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünşal-Kaçmaz K, Linn S. (2004). Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* **73**: 39-85.

Saran B, Karahan Z. (2010). Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış, *Turk Urol Sem*; **1**: 216-220

Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Lelebici E. (2004). Tohumlu bitkiler sistematiği. Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, No 116, İzmir.

Scandalios JG. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*; **38**(7):995-1014.

Schlegel, H., (1992). Produktion Sekundärer Metabolite, *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlag* s. 362-371.

Schofield M. J., Hsieh P., (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function, *Annu. Rev. Microbiol*; **57**: 579-608.

Sies, H. & Masumoto, H. (1997). Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a reactant with peroxynitrite. *Advances in Pharmacology* **38**, 229-246.

- 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): 229-233.
- 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. *Experimental Cell Research*, **175**:184-191.
- Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H, et al. (1999). hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; **8**: 669-674.
- Stojic L, Brun R, Jiricny J., (2004). Mismatch repair and DNA damage signaling, *DNA Repair* (Amst), Aug-Sep;**3**(8-9):1091-101.
- Şahin E. (2006). Bitkisel Kaynaklı Antimikrobiyallerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkileri, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi: 57s.
- Tahara S, Kassai S, Innoue M, Kawabata J, Mizutani J. (1994). Identification of mucondialdehyde as a novel stress metabolite. *Experientia*; **50**:137-41
- Tassaou, C.C., Nycas, J.E. and Scandamis P.N., (2004). Herbs and spices, in Handbook of Herbs and Spices, ch **3**, Eds. Peter, K. V., *Woodhead Publishing Ltd.*, England.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, and Burlinson B, Hartman A, Kobayashi H, et al. (2000). Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Mutation Research*; **35**: 206-221.

- Tokaç, D. (2007). Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Tu Y, Tor naletti S, Pfeifer GP. (1996). DNA repair domains within a human gene: Selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J*; **15**: 675-683.
- Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G. and Smid, E.J., (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, **63** (5), 620-624.
- Usman L.A., Hamid A.A., N.O. Muhammad, N.O. Olawore, T.I. Edewor, B.K. (2010) . Saliu *EXCLI* Chemical Constituents and Anti-Inflammatory Activitiy of Leaf Essential Oil of Nigerian Grown *Chenopodium album* L. *Journal*; **9**:181-186.
- Valero, M. and Salmeron, M.C., (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 73-81.
- Van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA, Mullenders LH., (2003). Nucleotide excision repair and its interplay with transcription, *Toxicology*, Nov **15**;193(1-2):79-90.
- Warma, S.D., Devamanoharan, P.S., Morris, S.M.,(1995). *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* **35**, 111-129.
- Wayner, D.D.M, Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R., Locke, S.J. (1987). *Biochem. Biophys.Acta*, **924**, 408-419.
- William S. Klug, Micheal R. Cummings. (2002). Genetik Kavramlar. Altıncı Baskıdan Türkçe çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara, 477-481.

- Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y. and Wu, J.T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*, **339**, 1-9.
- Yalçın AS. (1998). Antioksidanlar. Klinik Gelişim II; 342-6.
- Yarnell E, Abascal K. (2004). The Leading Publisher in Biotechnology. *Alternative & Complementary Therapies* Part 2: **10**: 277-284.
- Yapar B. (2006). Alfa Lipoik Asidin Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna Etkisi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Yıldırım Ş. (2003). The chorology of the Turkish species of Chenopodiaceae, Cistaceae, Convolvulaceae, Cornaceae and Corylaceae families. *The Herb J Sys Bot*; **10**:203-15.
- Yıldız B, Aktoklu E. (2010). Bitki sistematığı. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Yu BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*; **74**(1):139-62.
- Zeybek, N, Zeybek, U. (1994). Farmasötik Botanik, Ege Üniv. Yayınları, 436 s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Onur AKSOY
Doğum Yeri ve Tarihi : Kadıköy/16.09.1985
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05353556554/onuraksoy @msn.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hacı Hatice Bayraktar Lisesi/2000-2004
Lisans : 19 Mayıs Üniversitesi/2005-2009