



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ KAYNAKLI DNA
HASARININ MODİFİYE CUPRAC YÖNTEMİ
KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Seda UZUNBOY

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Haziran, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 19/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Kevser ŞÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 44302 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince danışmanım olarak, her zaman beni yönlendiren, güler yüzü ve tüm içtenliğiyle bana yardımcı olan, her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, birlikte çalışmaktan zevk aldığım değerli hocam *Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ*’ e

Tez çalışmam sırasında daima yol gösteren, deneyim ve bilgisini paylaşan değerli hocalarım *Sayın Prof. Dr. Reşat APAK, Prof. Dr. Hayati FİLİK* ve *Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN*’ a,

Çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen *Dr. Ferda DONDURMACIOĞLU, Uzman Yüksek Kimyager Ayşenur TUFAN*’ a ve her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı’ na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma,

Hayatım boyunca yanımda olduklarını bana her daim hissettiren, koşulsuz sevgileri ve bana olan inançları ile güç kazandığım, varlıklarından gurur duyduğum ve daima duyacağım değerli annem *Meryem UZUNBOY* ve babam *Murat UZUNBOY* ile sevgili kardeşlerim *Muhammed Can UZUNBOY, Eda YAVUZ* ve *Sema ÖRENGÜL*’ e

Yüksek lisans öğrenimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım *Aslı Neslihan AVAN* , *Asiye Aslıhan AVAN*, *Sevda AYDAR*, *Govigerel BAYARSAIKHAN* ve *Yasemin MÜMİN*’ e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2015

Seda UZUNBOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1.SERBEST RADİKALLER, ANTİOKSİDAN VE OKSİDATİF STRES.....	4
2.1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	4
2.1.2. Oksidatif Stres.....	7
2.2.DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT (DNA)	9
2.2.1.DNA’ya Dair Yapılan İlk Çalışmalar	9
2.2.2.DNA’nın Yapısı	10
2.2.3.DNA Tipleri	12
2.3.OKSİDATİF DNA HASARI.....	13
2.3.1.Oksidatif DNA Hasarı Tanım ve Genel Bilgiler.....	13
2.3.2.Oksidatif DNA Hasarını Açıklayan Hipotezler	15
2.3.3.Oksidatif DNA Hasarı Ürünleri Oluşum Mekanizması.....	17
2.3.4. DNA Hasarı Ürünleri	20
2.3.5.8-Hidroksi-2’-Deoksiguanozin	25
2.3.6.Oksidatif DNA Hasarının Ölçülmesi	28
3. MALZEME VE YÖNTEM	30
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	30
3.2. KİMYASAL MADDELER	30

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	31
3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Çözeltisi.....	31
3.3.2. Antioksidan Çözeltileri	31
3.3.3. Modifiye CUPRAC Reaktif Çözeltileri	31
3.3.3.1. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi	31
3.3.3.2. Neokuproin Çözeltisi	31
3.3.3.3. Amonyum Asetat Çözeltisi	31
3.3.3.4. Sodyum Karbonat Çözeltisi	31
3.3.3.5. pH 7.0 Fosfat Tamponu Çözeltisi	31
3.3.3.6. Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi	31
3.3.3.7. Amonyum Demir (II) Sülfat $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ Çözeltisi	32
3.3.3.8. Hidrojen Peroksit Çözeltisi	32
3.3.3.9. HCl Çözeltisi	32
3.3.3.10. NaCl Çözeltisi	32
3.3.4. TBARS Reaktif Çözeltileri	32
3.3.4.1. pH 7.4 Fosfat Tamponu Çözeltisi	32
3.3.4.2. Hidrojen Peroksit Çözeltisi	32
3.3.4.3. Demir (III) klorür hekzahidrat $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ Çözeltisi	32
3.3.4.4. Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi	32
3.3.4.5. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi	32
3.3.4.6. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi	32
3.3.4.7. Askorbik asit (AA) Çözeltisi	32
3.3.5. ABTS Reaktif Çözeltileri	33
3.3.5.1. ABTS / Persülfat Çözeltisi	33
3.3.5.2. PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi	33
3.3.6.8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Çözeltisi	33
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER	33
3.4.1. Orijinal CUPRAC Yöntemi	33
3.4.2. ABTS/Persülfat Yöntemi	33
3.4.3. DNA'nın Oksidatif Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Modifiye CUPRAC Metodu	34
3.4.3.1. Optimum H_2O_2 miktarının Belirlenmesi	34
3.4.3.2. Katalaz Etkisinin İncelenmesi	35
3.4.3.3. Reaksiyonun Durdurulması	35
3.4.3.4. Çözücü Etkisi	36

3.4.3.5. DNA Miktarı ile CUPRAC Absorbansları Arasındaki İlişki.....	36
3.4.3.6.Çeşitli Antioksidanların Varlığında Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi.....	37
3.4.3.7.8-hidroksi-2'-deoksiguanozine Modifiye CUPRAC Şartlarının Uygulanması.....	37
3.4.4. DNA nın Oksidatif Hasarının Ölçümünde Kullanılan TBARS Metodu	37
3.4.5. Yöntemler Arası Korelasyonun İncelenmesi	38
4. BULGULAR	39
4.1.CUPRAC YÖNTEMİ SONUÇLARI	39
4.2. ABTS SONUÇLARI	39
4.3. MODİFİYE CUPRAC YÖNTEMİ OPTİMİZASYONU	40
4.3.1.Optimum H ₂ O ₂ Miktarı.....	40
4.3.2.Katalaz Etkisi	41
4.3.3. Reaksiyonun Durdurulması	42
4.3.4.Çözücü Etkisi	44
4.3.5.DNA Miktarı ile CUPRAC Absorbansları Arasındaki İlişki.....	45
4.3.6.Çeşitli Antioksidanların Varlığında Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi..	46
4.3.7.8-hidroksi-2'-deoksiguanozine Modifiye CUPRAC Şartlarının Uygulanması.....	48
4.4. TBARS METODU VE İKİ YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI	49
4.4.1 DNA Miktarı ile Yöntem Lineerliği	49
4.4.2.Reaksiyonun Durdurulması	50
4.4.3. Yöntemlerin Karşılaştırılması	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	56
EKLER.....	59
EK-1 8-OHdG İÇİN KALİBRASYON DENKLEMLERİ	59
EK-2 ANTİOKSİDANLAR İÇİN KALİBRASYON DENKLEMLERİ.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.2: Nükleik asitlerde mevcut pürin ve pirimidin bazları.....	11
Şekil 2.3: DNA'nın yapısı	12
Şekil 2.4: DNA hasarını açıklayan Fenton Kimyası hipotezi.....	16
Şekil 2.5: DNA hasarını açıklayan Nükleaz Aktivasyonu hipotezi.....	17
Şekil 2.6: C8-OH katkılı radikalden guanin ürünlerinin oluşumunun mekanizması.....	18
Şekil 2.7: 8,5'-cdGuo'nun oluşum mekanizması	19
Şekil 2.8: DNA'da pürin bazlarının deaminasyon ve nitrasyonu	20
Şekil 2.9: DNA'da tanımlanmış serbest radikal kaynaklı bazı heterosiklik modifiye bazlar	21
Şekil 2.10: DNA'da tanımlanmış serbest radikal kaynaklı bazı şeker parçası ürünler.....	21
Şekil 2.11: 8-OHdG ve analoglarının kimyasal yapıları : (A) modifiye olmamış guanin bazı yapısı; (B) oksitlenmiş baz yapısı; (C) RNA'dan türeyen 8-OHdG analogunun yapısı; (D) DNA'dan türeyen 8-OHdG'nin yapısı	23
Şekil 2.12: 2'-deoksiguanozinin hidroksil radikali ile reaksiyonu ve 8-OHdG ve bunun tautomer formunun oluşum mekanizması.....	27
Şekil 4.1: 8-OHdG konsantrasyonu ile CUPRAC absorbansları arasındaki ilişki ($A = 1,85 \times 10^{-4}C - 0,0038$; $R^2 = 0,9942$).....	39
Şekil 4.2: ABTS Yönteminde 8-OHdG konsantrasyonu ile ΔA arasındaki ilişki ($\Delta A = 2,44 \times 10^{-4}C - 0,0121$; $R^2 = 0,9981$)	40
Şekil 4.3: (a) Modifiye CUPRAC yöntemindeki konsantrasyona eşit olacak şekilde seyreltilmiş H_2O_2 için CUPRAC spektrumu; (b) Modifiye CUPRAC yönteminde referans olarak kullanılan DNA'sız çözelti için kaydedilen spektrum	41
Şekil 4.4: Katalaz konsantrasyonu sırasıyla (a) 300 U mL^{-1} , (b) 150 U mL^{-1} , (c) 75 U mL^{-1} ve (d) 25 U mL^{-1} olacak şekilde hazırlanan katalaz çözeltilerinin 0,5'er mL ilavesiyle elde edilen CUPRAC spektrumları.....	42
Şekil 4.5: 25 U mL^{-1} 0,5 ml katalaz ilavesinden sonra DNA içeren Fenton inkübasyon çözeltilerinden farklı zamanlarda alınan örnekler için kaydedilen CUPRAC spektrumları: (a) 0. dakikada; (b) 5. dakikada; (c) 10. dakikada; (d) 20. dakikada	43
Şekil 4.6: CUPRAC metoduna göre HCl-NaCl varlığında DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği ($A = 3,7 \times 10^{-4}C + 0,164$; $R^2 = 0,9699$).....	46

Şekil 4.7: CUPRAC Yönteminde GSH konsantrasyonu ile absorbands azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 7,28 \times 10^3 C + 0,0346$; $R^2 = 0,9787$)	46
Şekil 4.8: CUPRAC Yönteminde CYS konsantrasyonu ile absorbands azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 3,42 \times 10^3 C + 0,0557$; $R^2 = 0,9862$)	47
Şekil 4.9: CUPRAC Yönteminde AA konsantrasyonu ile absorbands azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 2,71 \times 10^4 C - 0,0694$; $R^2 = 0,9983$)	47
Şekil 4.10: CUPRAC Yönteminde GA konsantrasyonu ile absorbands azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 4,63 \times 10^4 C + 0,1537$; $R^2 = 0,9721$)	48
Şekil 4.11: Modifiye CUPRAC yöntemine göre 8-OHdG konsantrasyonuna karşılık gelen absorbands değerleri ($A = 1,79 \times 10^4 C - 0,0124$; $R^2 = 0,9966$).....	49
Şekil 4.12: TBARS metoduna göre DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği.....	50
Şekil 4.13: HCl-NaCl varlığında TBARS metoduna ait DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği ($A = 2,4707C + 0,0715$; $R^2 = 0,9852$).....	50
Şekil 4.14: Konsantrasyonları aynı olacak şekilde hazırlanan DNA çözeltileri ile yapılan CUPRAC ve TBARS yöntemleri arası korelasyon grafiği ($y = 0,4715x - 0,0583$ $R^2 = 0,9799$).....	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Sık karşılaşılan reaktif oksijen türleri	5
Tablo 2.2: Sık karşılaşılan reaktif azot türleri	5
Tablo 2.3: Oksidatif stres biyobelirteçleri.....	9
Tablo 4.1: Farklı miktarlarda H ₂ O ₂ varlığında DNA'ya ait modifiye CUPRAC absorbansları..	40
Tablo 4.2: DNA'nın Fenton oksidasyonu sonrası HCl-NaCl varlığında reaksiyonun durdurulması sırasında santrifüj ve sürenin etkisi	43
Tablo 4.3: DNA'nın Fenton oksidasyonu sonunda TCA varlığında reaksiyonun durdurulması sırasında süreye bağlı olarak Modifiye CUPRAC absorbans değişimi	44
Tablo 4.4: 1:5000 seyrelmiş 0,5'er mL çözücülerin DNA'sız Fenton oksidasyonu sonrası okunan CUPRAC absorbansları	44
Tablo 4.5: Farklı oranlarda seyreltilmiş metanolün Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbansları.....	44
Tablo 4.6: Farklı oranlarda seyreltilmiş asetonun Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbansları.....	45
Tablo 4.7: Farklı oranlarda seyreltilmiş etanolün Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbansları.....	45
Tablo 4.8: İki farklı yöntem için aynı konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri	51

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
5-CHO-dU	: 5-Formildeoksiüridin
5-OH-Cyt	: 5-hidroksisitozin
5-OHMeUra	: 5-(hidroksimetil)urasil
5-OH-Ura	: 5-hidroksiurasil
8,5'-cdGuo	: 8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin
8-OH-Ade	: 8-hidroksiadenin
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
8-OHG	: 8-hidroksiguanozin
8-OH-Gua	: 8-hidroksiguanin
A	: Adenin
AA	: Askorbik Asit
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)
CAT	: Katalaz
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite
CYS	: Sistein
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FapyAde	: 4,6-diamino-5-formamidopirimidin
FapyGua	: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
G	: Guanin
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
$\text{HO}_2^\cdot$	: Hidroperoksil radikali
$\text{LOO}^\cdot$	: Lipid peroksit radikali
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
Nc	: 2,9-dimetil 1,10-fenantrolin hidroklorür
$\text{NO}^\cdot$	: Azot oksit
NO_2^+	: Nitronyum katyon
$\text{NO}_2^\cdot$	: Azot dioksit
$\text{O}_2^{\cdot-}$	: Süperoksit radikali
$\text{OH}^\cdot$	: Hidroksil radikali
ONOO $^-$	: Peroksinitrit
$\text{R}^\cdot$	: Karbon merkezli radikal
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reaktif azot türleri

RO•	: Alkoksi radikali
RO₂•	: Peroksil radikali
ROONO	: Alkil peroksinitrit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S	: Sitozin
SOD	: Süperoksit dismutaz
T	: Timin
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	: Trikloroasetik asit
THF	: Tetrahidrofuran

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ KAYNAKLI DNA HASARININ MODİFİYE CUPRAC YÖNTEMİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

Seda UZUNBOY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Oksijenli solunum yapan bir canlı olarak insan vücudunda reaktif oksijen ve azot türleri (sırasıyla ROS ve RNS) olarak adlandırılan bir takım oksidan maddeler gerek vücudun doğal işleyişi sırasında gerekse dış etkenlerle sürekli olarak oluşmaktadır. Bu maddelerin ortak özellikleri vücuttaki lipid, protein ve nükleik asitlere zarar vermesidir. Kanserojen ya da mutajen olarak bilinen bu türler genellikle kararlı olmadıklarından doğrudan tayin edilmeleri zordur. Bu anlamda oksidatif DNA hasarının belirlenmesinde, reaktif türlerin hücre çekirdeği ya da mitokondride bulunan DNA'ya saldırması sonucu oluşan çeşitli ürünlerden yararlanılır. Bunlar arasında en yaygın olanlar 8-hidroksiguanin (8-OHG) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) dir. 8-OHdG tayininde sıklıkla kullanılan analitik teknikler HPLC-MS ve GC-MS dir. Ancak bu yöntemlerin uygulanmasında pahalı teknik donanım ve uzman operatörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmada DNA hasarının ölçülmesinde modifiye CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. CUPRAC Yöntemi önce gıdalarda daha sonra ise biyolojik ortamlarda toplam antioksidan kapasite (TAC) tayini amacıyla kullanılmış olup daha sonra çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere modifiye edilmiştir. Bu sayede salisilat probu kullanılarak hidroksil radikallerinin tayini ve çeşitli antioksidanların radikal süpürme etkinliklerinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada salisilat probu yerine DNA kullanılarak, DNA Fenton Yöntemi ile oluşturulan hidroksil radikallerince oksidatif hasara uğratılmış ve elde edilen oksidasyon ürünlerine modifiye CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Burada DNA'nın kendisi CUPRAC reaktif değilken elde edilen oksidasyon ürünleri CUPRAC reaktifi ile reaksiyon verebilmektedir. Çalışmada DNA

hasarı sonucunda oluşan ürünlerin miktarının belirlenmesinde standart madde olarak 8-OHdG den yararlanılmıştır. Deneysel koşullar optimize edildikten sonra reaksiyon ortamına radikal süpürücü olarak seçilen antioksidan çözeltileri eklenmiş ve antioksidanların radikal süpürme etkinlikleri nedeniyle oluşan DNA hasar ürünlerinde azalma belirlenmiştir. Modifiye CUPRAC Yöntemi ile belirlenen DNA'nın oksidatif hasarı daha önce literatürde yer almış olan ve benzer temelle dayanan bir başka spektrofotometrik yöntem ile kıyaslanmıştır. Bu yöntemle göre DNA'nın uygun koşullar altında Fenton Reaktifi ile üretilen hidroksil radikalleri ile oksidatif hasara uğratılması sonucu oluşan ürünler TBARS Yöntemi (Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler "Thiobarbituric acid reactive substances") ile belirlenmiştir. Yapılan denemelerde Fenton Yöntemiyle oksidasyonunun ardından son konsantrasyonu 0,003 ile 0,03 mg mL⁻¹ arasında değişen miktarlarda DNA'ya Modifiye CUPRAC Yöntemi uygulanmış ve kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Bu kalibrasyon doğrusu için belirlenen doğru denklemi $A = 37,512 \times C_{DNA} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} + 0,164$ olup R² değeri 0,9699'dur. TBARS Yönteminde ise 0,017 mg mL⁻¹ – 0,087 mg mL⁻¹ arasında değişen miktarlarda DNA için benzer şekilde elde edilen doğrunun denklemi $A = 5,0123 \times C_{DNA} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} + 0,2527$ olup R² değeri 0,9666'dır. TBARS ve Modifiye CUPRAC yöntemleri arası korelasyonu sağlamak için son konsantrasyonları 0,017 mg mL⁻¹ – 0,087 mg mL⁻¹ aralığında değişen DNA'ya iki yöntem uygulanmıştır. Daha sonra CUPRAC absorbanları x eksenine TBARS absorbanları y eksenine konularak iki yöntem arasındaki lineer korelasyon incelenmiştir. Bu yöntem ile elde edilen doğrunun R² değeri 0,9799 olarak belirlenmiş olup iki yöntemin birbiriyle yüksek bir korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Haziran, 2015, 73 sayfa

Anahtar kelimeler: DNA, reaktif oksijen türleri, oksidatif DNA hasarı, antioksidan, CUPRAC

SUMMARY

M. Sc. THESIS

INVESTIGATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCED DNA DAMAGE USING MODIFIED CUPRAC METHOD

Seda UZUNBOY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

As an aerobic organism, different oxidants called as reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) generate continuously either via body's natural functions or by external factors. As a common feature these substances damage to lipids, proteins and nucleic acids in the body. Because of these species, which are known with their carcinogenic and mutagenic properties, are unstable and it is hard to assess them directly. In this sense, on determination of oxidative DNA damage, various products resulting in the attack of reactive species to nucleic or mitochondrial DNA are utilized. The most common of these are 8-hydroxy guanine (8-OHG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Commonly used analytical techniques for determination of 8-OHdG are HPLC-MS and GC-MS. However, to apply these methods, expensive technical equipment and specialized operators are needed. In this study, for measurement of DNA damage the modified CUPRAC method was applied. CUPRAC was used for determining total antioxidant capacity (TAC) firstly in food and then later in biological media, then the method was modified to use various purposes. Thus, the determination of hydroxyl radicals and investigation of radical scavenging effects of some antioxidants was conducted by using salicylate probe. In this study by using DNA instead of salicylate probe, DNA was damaged oxidatively by means of hydroxyl radicals produced through Fenton Method. Herein while DNA isn't CUPRAC reactive itself, obtained oxidation products can react with CUPRAC reactive. In the study, in determination of the amount of products resulting from DNA damage, 8-OHdG was used as the standard substance. After optimization of experimental conditions selected antioxidants were added to the reaction medium as radical scavenger and the decrease in the DNA oxidation products due to radical scavenging activities of them was

determined. The DNA damage which has been determined by Modified CUPRAC Method was compared with another spectrophotometric assay based on a similar principle and previously described in the literature. According to this method the products resulting from oxidative damage of DNA by hydroxyl radicals produced with Fenton reaction under suitable conditions were determined through TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) method. In the experiments after oxidation through Fenton method, the modified CUPRAC method was applied to varying amounts of DNA in a final concentration of between 0.003 and 0,03 mg mL⁻¹ and a calibration graph was drawn. The calculated equation of the calibration graph is $A = 37.512 \times C_{\text{DNA}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} + 0.164$ with $R^2=0.9699$. Whereas for TBARS method a calibration graph was drawn similarly for different amounts of DNA in a final concentration between 0,017 - 0,087 mg mL⁻¹ and for this graph calculated equation is $A = 5,0123 \times C_{\text{DNA}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} + 0,2527$ with $R^2=0,9666$. To find the correlation between two methods, TBARS and Modified CUPRAC methods were applied to varying amounts of DNA in a final concentration of between 0.017 and 0,087 mg mL⁻¹. Then correlation between the two methods were investigated by putting Modified CUPRAC Method absorbances in x-axis and TBARS Method absorbances in y axis. The R^2 value was calculated as 0,9799 for the graph drawn as described above and it was determined that the two methods showed a high correlation with each other.

June, 2015, 73 pages

Keywords: DNA, oxidative DNA damage, reactive oxygen species, antioxidant, CUPRAC

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS)'nin vücutta neden olduğu mutajenik etkilerin kanserin oluşumu, gelişimi ve ilerlemesi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Vücutta genetik değişikliklere neden olan eylemler olarak tanımlanabilecek bu mutajenik etkiler DNA'nın yapısal değişimi, sitoplazma ve çekirdekte gerçekleşen sinyal iletimi, hücrelerin çoğalması, ölümü gibi olaylardan sorumlu gen ve proteinlerin aktivitelerinde değişiklikler olarak özetlenebilir [1]. Mutajenik eylemin çok ileri düzeyde olmayışı ve düşük stabilitelerinden dolayı mutajenler kolaylıkla tespit edilememektedir. Bu nedenle, pek çok mutajen ve kanserojen ajanın başta guanin olmak üzere nükleik asit bazlarıyla reaksiyon vermesi temelinden yola çıkılarak reaksiyon ürünlerinin tespiti gündeme gelmiştir [2]. DNA hasarına yol açan kimyasal olayların başında oksidasyon, deprinasyon, metilasyon ve deaminasyon gelir. DNA hasarında çeşitli ROS' nin etkisi laboratuvar koşullarında oldukça iyi şekilde karakterize edilmiş olmasına rağmen henüz etkisi karakterize edilmemiş pek çok ROS ve RNS bulunmaktadır. ROS saldırısının en sık rastlanan etkisi guaninin, 8-hidroksiguanine dönüşümüdür. Bu anlamda oksidatif DNA hasarının belirlenmesinde en sık ölçülen parametrelerden biri 8-hidroksiguanin veya nükleosidi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) dir [1]. Oksidasyon sırasında guanin molekülünün 8. mevkisine bir hidroksil grubu katılır ve guaninin oksidasyon ürünü oluşur [3].

İnsan vücudunda DNA hasarı bir seri enzim tarafından onarılmaya çalışılmaktadır ancak yapılan çalışmalar bu enzimlerin modifiye bazıları tamamen uzaklaştırmada başarılı olamadıklarına işaret etmektedir. Bununla bağlantılı olarak hepatit, romatoid artrit gibi bir dizi kronik iltihaplı hastalık ile mitokondrial DNA hasarı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Ayrıca akciğer, kolon, böbrek, göğüs, mesane kanserleri ve çift taraflı prostatik hiperplazisi vakalarında tümörlerden biyopsi ile alınıp izole edilen DNA'larda baz hasarına rastlanmıştır [1].

Vücutta DNA hasarına yol açan RO(N)S bileşikleri yalnızca doğal yollarla oluşmaz. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda, Fenton tipi reaktifler, X-ışınları, sigara dumanı, asbest başta olmak üzere değişik kaynaklardan türeyen oksijen radikalleri, singlet oksijen, peroksinitrit ve süperoksit gibi pek çok bileşiğin çeşitli mekanizmalar üzerinden DNA' dan 8-OHdG oluşumuna neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca vitamince zayıf diyetler ve alkol tüketiminin de 8-OHdG düzeyini arttırdığı saptanmıştır [4].

İdrarda yapılan analizler ise toplam DNA hasarının belirlenmesinde yararlıdır. Çünkü vücutta onarım işlemi gerçekleştikten sonra yapılan ölçümleri kapsar. İdrarda yapılan çalışmalarda ölçülen çeşitli baz hasarı ürünleri mevcuttur. Bunlar arasında en çok çalışılan da 8-OHdG' dir. 8-OHG de çok çalışılan bir başka bileşiktir ancak 8-OHG' nin idrardaki miktarı beslenmeye bağlı olarak değişebilmektedir. Pişirilmiş gıdalarla alınan yükseltgenmiş DNA ve lipidler yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir. 8-OHG yalnızca yükseltgenmiş DNA dan değil yükseltgenmiş RNA dan da kaynaklanabilmektedir. 8-OHdG ise diyetten etkilenmez, bunun nedeni nükleozitlerin mide veya bağırsakta absorplanmayışdır. Ancak idrardaki tek 8-OHdG kaynağının da DNA bazı hasarı olmadığı unutulmamalıdır [1].

DNA'nın oksidatif olarak yükseltgenme ürünlerinin belirlenmesinde kullanılmakta olan çeşitli analitik teknikler mevcuttur. Bu teknikler arasında GC ve HPLC yöntemlerinin kütle spektroskopisi ile birleşimi belki de en yaygın olanlardır [5]. Yapılan bir çalışmada [6], insan idrarında biomarkır olarak yaygınca kullanılan 8-OHdG LC-MS/MS ile tayin edilmiştir. Aynı çalışmada, (5'S)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin ve (5'R)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin varlığı tespit edilmiş, ve bunların karsinogenez gibi hastalık süreçleri için uygun biomarkırlar olduğu ortaya konmuştur.

Yine aynı çalışma grubu farklı bir çalışmada [7], 8-Hidroksi-2'-deoksiadenozinin DNA'daki varlığını LC/MS ile tespit etmişler, ve bu tekniğin 8-OH-dAdo ölçümü için uygun bir teknik olduğunu göstermişlerdir. Bunların dışında Watson, tayinin doğruluğunu arttırmak için iç standart olarak analitin işaretlenmiş stabil-izotop analogununun kullanıldığı bir izotop seyreltme MS (IDMS) yöntemi önermiştir [8].

Özellikle klinik ortamlarda yöntemleri uygulamanın güçlüğü nedeniyle tercih edilen yöntem genellikle ELISA' dır. Ancak ELISA testinin HPLC den alınan sonuçlar ile her zaman uyumlu olmadığı da yine literatürde belirtilmiştir [3].

Özyürek ve ark. tarafından salisilat proba uygulanan Modifiye CUPRAC yönteminde Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalleri üretilmiş ve bu radikallerin salisilat probu parçalaması sonucu CUPRAC reaktif ürünlerin antioksidan varlığında ve yokluğunda tayini sağlanmıştır [9,10]. Yapılan çalışmada bu yöntem geliştirilmiş, hidroksil radikalleri ile DNA'ya oksidatif hasar verilmiştir. Bu hasarın sonucu olarak oluşan CUPRAC reaktif maddelerin antioksidan varlığında radikal süpürme etkinliği ortaya konmuştur.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir yöntem ise DNA hasarı bazında hidroksil radikal süpürme ölçümüne dayanan bir yöntemdir [11]. Fenton reaksiyonu ile radikal oluşturularak reaksiyon sonucu oluşan tiyobarbitürük asit reaktif maddelerin reaksiyonuna dayanan bu yöntem ile önerilen modifiye CUPRAC metodu arasında bir korelasyon ortaya konmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.SERBEST RADİKALLER, ANTİOKSİDAN VE OKSİDATİF STRES

2.1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom ve moleküllerdir. Hem organik hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar. Stabil değildirler. Elektron konfigürasyonlarını pozitif yüke dengelemeleri gerektiğinden çok aktiftirler [12]. Aerobik hücrelerdeki serbest radikal biyokimyasının en önemli reaktanları oksijen ve onun radikal türevleridir.

Serbest oksijen radikalleri yaşam sürelerinin çok kısa olmasına ve miktarca düşük derişimlerde bulunmalarına rağmen çok aktif yapılı zararlı bileşiklerdir. Tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliğine sahiptirler. Proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ile reaksiyona girerek bu yapılarda fonksiyonel ve yapısal değişikliklere yol açarlar. Bu değişiklikler; oksidasyon, köprüleşme (disülfür bağları, protein- protein bağları, protein-lipid bağları) protein sarmalında kesilme, kromozom kırılmaları, mutasyonlar şeklinde sıralanabilir. Sık karşılaşılan radikaller ve simgeleri tablolarda verilmiştir [12,13].

Tablo 2.1: Sık karşılaşılan reaktif oksijen türleri[14]

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen, $^1O_2$
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Ozon, O_3
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	

Tablo 2.2: Sık karşılaşılan reaktif azot türleri[14]

Radikaller	Radikal olmayanlar
Azot oksit, $NO^{\bullet}$	Nitröz asit, HNO_2
Azot dioksit, $NO_2^{\bullet}$	Nitrozil kation, NO^+
	Nitrozil anyon, NO^-
	Diazot tetraoksit, N_2O_4
	Diazot trioksit, N_2O_3
	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Nitronyum kation, NO_2^+
	Alkil peroksinitrit, $ROONO$

RNS arasında sık karşılaşılan türlerden birisi $NO^{\bullet}$ 'dir. Azot oksit radikali bir eşleşmemiş elektrona sahip küçük bir moleküldür ve L-arginin amino asitinden organizmada üretilir. Bu radikalın uygun koşullarda süperoksit anyonu ile reaksiyonundan ise daha oksidatif olan peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) oluşur [15]. Azot oksit her ne kadar serbest radikal türü olsa da, nükleik asitlere direkt olarak saldırarak kadar reaktif değildir [16].



Fizyolojik süreçler, metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonların bir parçası olarak aerobik organizmaların canlı hücrelerinde sürekli olarak ROS oluşur. Vücutta üretilen bu ROS'lar önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir ancak reaktif doğalarından ötürü DNA, proteinler ve hücre membranlarının lipidlerinin oksidatif hasarına neden olabilirler. Ayrıca, kanserojen maddeler, asbest, sigara dumanı ve UV radyasyonu gibi dış faktörler de çeşitli koşullar altında ROS üretebilirler [17,3].

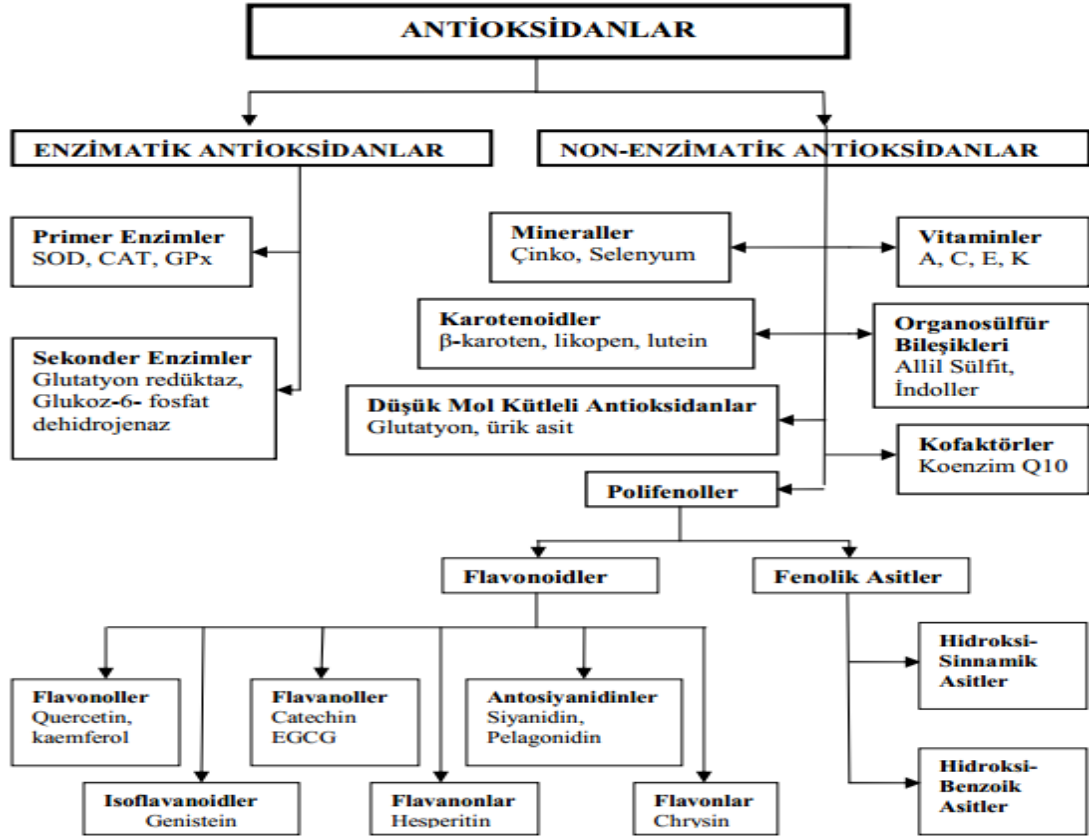
Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak üretilen reaktif oksijen metabolitleri, başta mitokondriyal elektron taşınımı olmak üzere ksenobiyotik (Vücuda alınan yabancı maddelerin karaciğerde zehirsizleştirme işlemine uğratılması) metabolizması, fagositik aktivasyon (vücut içindeki yabancı organizma ve maddelerin sindirilerek yok edilmesi), çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında oluşmaktadır [18,12].

Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerinin, oksidanların, hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, bu hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarı, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Bu oksidanlar canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve alfa-tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılırlar. Serbest radikallerin hasar verme özelliklerinden dolayı diyabet, iskemi reperfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma, kas hastalıkları gibi birçok hastalıklara yol açtığına dair çalışmalar bulunmaktadır [19].

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [20]. Bir başka tanım ise, “havadaki oksijenin etkisi ile ürünlerin bozulmasını önlemek veya geciktirmek için ürünlere katılan doğal veya sentetik maddelerdir” şeklindedir. Biyokimya ve tıp alanındaki tanıma göre antioksidanlar, enzimler ve diğer organik maddeler olup - E vitamini β -karoten gibi - hayvan dokularında oksidasyonun zararlı etkileriyle mücadele etme yeteneğine sahiptir [21].

Gıdalarda antioksidanlar, küçük miktarlarının yağlar gibi kolay okside olabilen materyallerin oksidasyonunu büyük oranda geciktiren veya önleyebilen maddeler olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle gıda biliminde antioksidanlar, tümüyle olmasa bile lipid peroksidasyonunun zincir kırma inhibitörleri ile eşdeğerdir. Böylece birçok antioksidanlar yiyecek ve içeceklerde, makromolekülleri oksidasyondan koruyan moleküller olarak kullanılır. Biyolojik sistemlerde ise bu tanım, okside olabilen

substrata kıyasla daha düşük konsantrasyonda varlığında substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir. Bu, oksidasyondan etkilenebilen, çok daha hassas makromolekülleri (DNA, lipidler, proteinler vs.) kapsayan geniş bir tanımdır [22]. Aşağıdaki şekilde antioksidanların genel bir sınıflandırılması verilmiştir [23].



Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması

2.1.2. Oksidatif Stres

Canlı sistemler, çeşitli nedenlerle (UV, kimyasal oksidanlar, hava kirliliği ya da iç etkenler) aşırı miktarlarda üretilen serbest radikaller ile bu radikallerin zararsızlaştırılmasından sorumlu içsel ve dış kaynaklı antioksidanlar arasında kurulu hassas bir dengeye sahiptirler. Bu dengenin oksidanlar yönünde bozulması **oksidatif stres** olarak tanımlanır ve bu stres birçok hastalığın oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynar [22]. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır [18]. Bununla birlikte,

oksidatif stres durumunun ölçümü, düzeltme ve onarımı yapan kompleks içsel savunma sistemlerin olmasından dolayı zor olabilir. Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu olabilir. Bu nedenle, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile olabilir [19].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle reaktif oksijen ve azot kaynaklı oksidatif stresin, kanser, diyabet, katarakt, romatoid artrit ve yaşlanma gibi çeşitli inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklarda rol oynadığı kanıtlanmıştır [24]. İnsanlarda, oksidatif stres, genellikle, kronik hastalığı başlatmamakla birlikte hastalığı destekleyici rol oynamaktadır. Bu nedenle, biyolojik sistemler ve gıda moleküllerinde doğal olarak meydana gelen antioksidan aktivitesinin etkinliğine artan ilgi vardır [22].

Oksidatif stres, genelde lipit peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA); oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG); protein oksidasyonu; SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir. Oksidatif stres durumunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılan belli başlı yöntemler Tablo 2.3'de özetlenmiştir [19].

Tablo 2.3: Oksidatif stres biyobelirteçleri

	Parametreler
1.Radikallerin ölçümü	Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi(EPR)
2.Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümü	a)Lipid peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi Malondialdehit (MDA) Aldehitler b)Protein hasarının belirlenmesi c)DNA hasarının belirlenmesi 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)
3.Antioksidan savunma sistemlerinin ölçümü	a)Antioksidan enzimlerinin değerlendirilmesi Süperoksit dismutaz (SOD) Glutasyon peroksidaz (GPx) Katalaz (CAT) Glutasyon-S-Transferaz (GST) Glutasyon redükraz (GR) b)Total antioksidan aktivitenin belirlenmesi c)Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların ölçümü (LMWA) Alfa-tokoferol Askorbik asit Glutasyon Melatonin
4.Enzim kofaktörlerinin ölçümü	Cu, Zn, Mn, Fe elementleri

2.2.DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT (DNA)

2.2.1.DNA'ya Dair Yapılan İlk Çalışmalar

İlk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından irindeki akyuvarlarda genetik materyalin varlığı saptanmıştır [25]. Miescher sitoplazmadan “nüklein” adını verdiği asidik bir maddeyi izole etmiştir. 1910’larda Phoebus A. Levene, nükleotidlerin nükleik asitlerdeki kimyasal yerleşimini açıklamak için “tetranükleotid hipotezini” önermiştir. Son derece basit dört nükleotid birimi DNA’da devamlı tekrarlanmaktadır. Dört nükleotidin oldukça değişen oranlarda bulunduğunu gösterdiği halde Levene, bu oranın 1:1:1:1 olduğunu varsaymıştır. 1940’lardan sonra, Erwin Chargaff’ın çalışmaları, Levene’nin hipotezinin doğru olmadığını farkına varılmasına yol açmıştır. Chargaff, birçok organizma için 1:1:1:1 oranının doğru olmadığını göstermiştir.

DNA'nın genetik materyal olduğu yönündeki kanıt ilk defa bakteri ve bakteriyofajlarla yapılan çalışmalar sırasında elde edilmiştir [26]. Daha sonra 1944 yılında Avery ve arkadaşları, oluşturdıkları koloni morfolojisine göre S tipi (Smooth - düzgün kenarlı koloni oluşturan) pnömokoklardan izole ettikleri deoksiribonükleik asidi (DNA), R tipi (rough - kenarı düzgün olmayan koloni oluşturan) bakterilerle inkübe ettiklerinde yeni oluşan pnömokokların hepsinin S tipi koloni oluşturdıklarını görmüşler ve böylece DNA'nın kalıttan sorumlu molekül olduğunu bildirmişlerdir. DNA'nın genetik materyal olduğunu destekleyen ikinci önemli bulgu, *Escherichia coli* bakterisinin, konakçısı olduğu viruslerden biri olan T2 bakteriyofaj ile enfeksiyonu çalışmalarından elde edilmiştir. Nitekim 1953 yılında Watson ve Crick adlı araştırmacıların çift sarmallı DNA yapısını ortaya koymaları bu konuda önemli bir dönüm noktası olmuştur [25]. Ve 1953'te Nobel Ödülünü almışlardır [26].

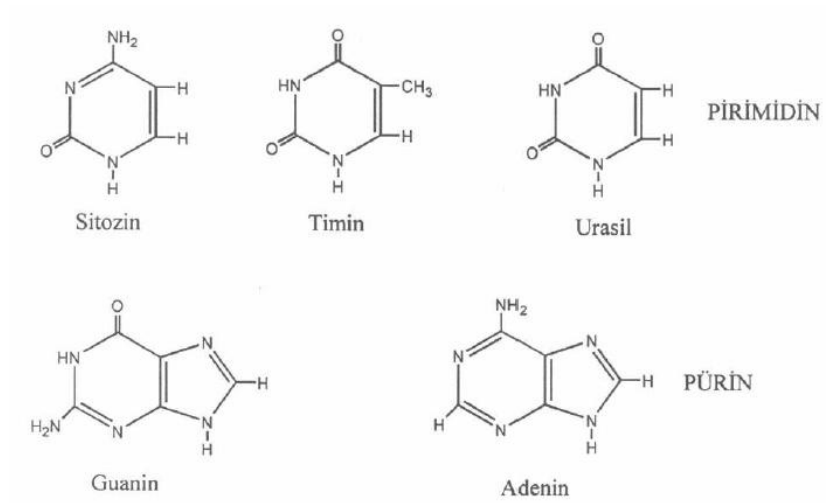
2.2.2.DNA'nın Yapısı

DNA'nın 3 bileşeni vardır:

1. Azotlu baz
2. Pentoz şekeri (5-karbonlu şekere)
3. Fosfat grubu [26]

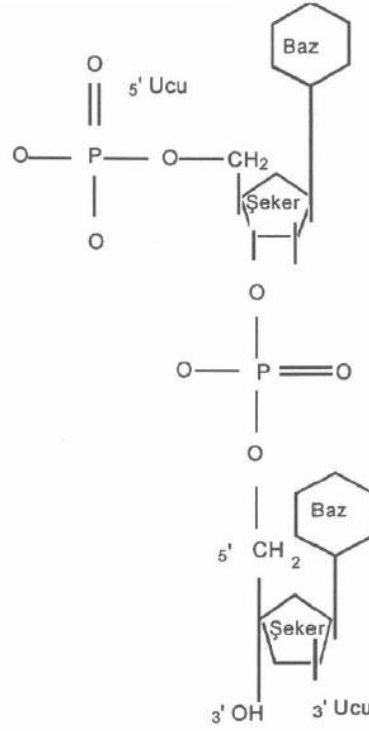
DNA da 5 karbonlu şekerlerden deoksiriboz bulunur. Deoksiribozun 1. karbonuna glikozid bağ ile tutunmuş bazlar pürin ve pirimidin olmak üzere iki tiptir. Pürin bazları adenin (A) ve guanin (G), Pirimidin bazları ise sitozin (C) ve timin (T) dir. Bazların yapısı Şekil 2.2 de gösterilmiştir.

DNA da bulunan bazlar kantitatif olarak Edwin Chargaff tarafından incelenmiş olup adenin miktarının timine, guanin miktarının ise sitozine eşit olduğu görülmüştür. Chargaff kuralı olarak bilinen bu kural; kısaca A=T ve G=C olarak özetlenebilir. Adenin ile timin arasında iki, guanin ile sitozin arasında üç adet hidrojen (H) bağı bulunur.



Şekil 2.2: Nükleik asitlerde mevcut pürin ve pirimidin bazları

Deoksiribonükleik asidin çift iplikli yapısına Watson-Crick sarmalı (double-heliks) adı verilmektedir. 20 Angstrom çapındaki sarmalda bazlar 3.4 Angstrom aralıklarla sıralanmıştır ve sarmal her 10 bazda bir dönüş yapmaktadır. Sarmaldaki iplikler antiparalel olup bir iplik 5'—>3', diğer iplik ise 3'—>5' yönündedir. Şeker ve fosfat omurgasından oluşan iplikler birbirlerine hidrojen bağları ile zayıf olarak bağlanmışlardır. Omurga oluşturulurken şekerin 5 numaralı karbonuna bağlı fosfat grubunun hidroksili ile diğer nükleotiddeki şekerin 3' karbon atomuna bağlı hidroksil grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Bu yapı Şekil 2.3 de ifade edilmiştir.



Şekil 2.3: DNA'nın yapısı

Normal fizyolojik koşullarda DNA yapısını korur ancak yüksek sıcaklık ve kuvvetli asidik ortamda hidrojen bağlarının çözülmeleri sonucu heliks açılarak tek iplik haline geçer. Bu olaya denatürasyon adı verilir. Ancak şeker ve fosfat arasında bulunan fosfodiester bağları etkilenmediği sürece şartlar eski haline dönüştürülürse tek iplikli DNA, hidrojen bağları kurarak tekrar eski formunu alır, bu olaya da renatürasyon denir.

2.2.3.DNA Tipleri

İnsan genomundaki DNA'nın organizasyonu oldukça komplekstir. Ökaryotik bir genom incelendiğinde DNA'nın bazı kesimlerinin kodlandığı yani proteine dönüştüğü, büyük bir bölümünün ise kodlanmadığı görülmektedir.

Bugünkü bilgilere göre insan genomunda 3 tip DNA görülmektedir.

a. Tek Kopya (Unique) DNA; Genomun % 75 ini oluşturur; 50000 ila 100000 gen içerir ve dolayısıyla kodlama yaparlar. Tüm genom boyunca yerleşmişlerdir.

b. Tekrarlayan Dağınık DNA Dizileri; Genomun % 15 inde bulunurlar. Belirli nükleotid dizileri aynen veya birtakım varyasyonlarla yüzlerce hatta milyonlarca kez tekrarlanır. Kodlama yapmazlar, DNA'nın yapısının korunmasında rol oynarlar. Tüm genom boyunca genler ve tek-kopya dizileri arasında dağınık olarak bulunurlar.

c. Satellit DNA; Oldukça sık tekrarlayan dizilerdir. Genomun % 10 unda bulunurlar. Sentromer ve telomer gibi belirli bölgelerde yerleşmişlerdir [25].

2.3.OKSİDATİF DNA HASARI

2.3.1.Oksidatif DNA Hasarı Tanım ve Genel Bilgiler

Serbest radikallerden özellikle aktivitesi yüksek olan hidroksil radikali DNA'ya ve diğer biyolojik moleküllere zarar verir. Bu tip DNA hasarları '**oksidatif DNA hasarı**' olarak bilinir ve istenmeyen mutasyonlara, kansere ve yaşlanmaya neden olur. Oksidatif DNA hasarı hücresel onarım sistemi ile karşı karşıya gelir ve tamir edilebilir [5]. DNA kararlı bir yapı olmasına rağmen yaşam süresi boyunca fizyolojik koşullarda kendiliğinden oksidatif hasara maruz kalabilir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür. Örneğin pürin kaybı ile apuridik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilmektedir. Ayrıca deaminasyon ile sitozinden urasil veya 5-metil sitozinden timin oluşabilir. DNA hasarı ve onarımı arasında kararlı denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde DNA hasarı, sağlıklı bireylerde de saptanır. [27]. Tüm canlı hücrelerde, hasarlı DNA enzimatik olarak tamir edilir. Böylece normal fonksiyonlarını geri kazanırlar. Ancak tamir edilemeyen DNA kansere yol açan mutasyonlara (baz süstitüsyonları gibi) neden olabilir. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma meydana gelmesine rağmen, en fazla ilgi nükleobaz modifikasyonları ve özellikle 8-okso-2'-deoksiguanozinin lezyonu üzerindedir. Çünkü bu vücutta üretilir ve kantitatif olarak ölçülebilir [13,14, 17].

DNA’da oksidatif hasar yapan başlıca etkenler: iyonize radyasyon, yüksek oksijen derişimi, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratlarıdır [12].

Temel biyomoleküllere (protein, membran lipidleri ve DNA) hasar veren en önemli serbest oksijen radikali hidroksil radikalidir ($\text{OH}\cdot$). Hidroksil radikali, çeşitli mekanizmalar ile özellikle hidrojen peroksidin Fenton reaksiyonu ile üretilir [17]. Hidroksil radikali için radyasyon bir kaynak olabilir. Ancak, radyasyon ile üretilen $\text{OH}\cdot$, tüm hücrede oluşturulup ancak küçük bir kısmı DNA hasarında aktif rol oynamaktadır. Diğer $\text{OH}\cdot$ kaynakları $\text{O}_2^{\cdot-}$ ’nin HOCl ile reaksiyonu ve azot oksit radikalinin ($\text{NO}\cdot$) $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonudur. Nitrik oksit, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile çok hızlı reaksiyon verir ve ONOO^- oluşturur. Bu da, $\text{RO}_2\cdot$ ve $\text{RO}\cdot$ ile organik peroksinitritleri verir. ONOO^- doğrudan DNA bazlarına hasar vericidir ve fizyolojik pH’da $\text{NO}_2^{\cdot}$, $\text{OH}\cdot$ ve NO_2^+ ile özdeş ya da benzer olan çeşitli toksik ürünlere dönüşür.

Devam eden DNA hasarına katkıda bulunması olası içsel reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depurinasyon ve deaminasyon gibi reaksiyonlardır. Azot oksit ya da $\text{NO}_2^{\cdot}$, ONOO^- , N_2O_3 ve HNO_2 gibi bundan türeyen reaktif türler DNA’da nitrasyon, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları üretme potansiyeli ile mutajenik ajanlardır.

Farklı ROS’lar DNA’ya farklı yollarla hasar verirler. Örneğin, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 DNA bazlarıyla reaksiyona girmezler. $\text{OH}\cdot$, dört DNA bazından çok sayıda ürünler üretirken, $^1\text{O}_2$ seçici olarak guanine saldırır [1]. $^1\text{O}_2$ dal kırığından daha çok, guanine türevli ürünler olan 8-hidroksiguanin ve FAPyGuanin (FAPyG) oluşturmaktadır [12]. Oksidatif DNA hasarının indeksi olarak sıklıkla ölçülen ve üretilen en yaygın baz lezyonu 8-hidroksiguanindir. Bu bazen nükleozid olarak da, 8-hidroksideoksiguanozin, ölçülür [1].

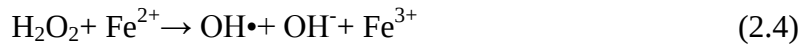
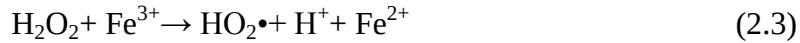
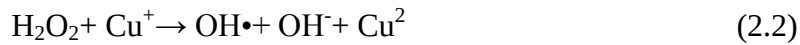
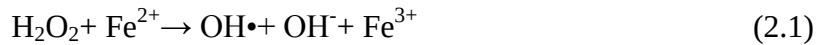
RNS (NO_2 , ONOOH , N_2O_3 , HNO_2 vb.) ise DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO^- guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan kendiliğinden depurinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur [18].

Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Lipid oksidasyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarında metaller kritik rol oynamaktadır. LOOH etkisi ile DNA'da tek dal kırığı oluşumunda Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının katalitik etki yaptığı ve Fe^{2+} 'nin, Fe^{3+} 'den daha etkin olduğu öne sürülmüştür [28]. Hücreler ultraviyole ışığa (UV) maruz kaldığında da DNA hasarı oluşmaktadır. İki şekilde DNA hasarı meydana gelebilir. UV ışık H_2O_2 'e etki ederek $\text{OH}\cdot$ radikali meydana getirebildiği gibi doğrudan pirimidinlerin kovalent çapraz bağlanmasına ve pirimidin dimerlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. İonizan radyasyonun suyun homolizine neden olarak, $\text{OH}\cdot$ radikallerini oluşturduğu ve bu yolla mutasyon ve kanser oluşumu gibi etki gösterdiği bilinmektedir [29].

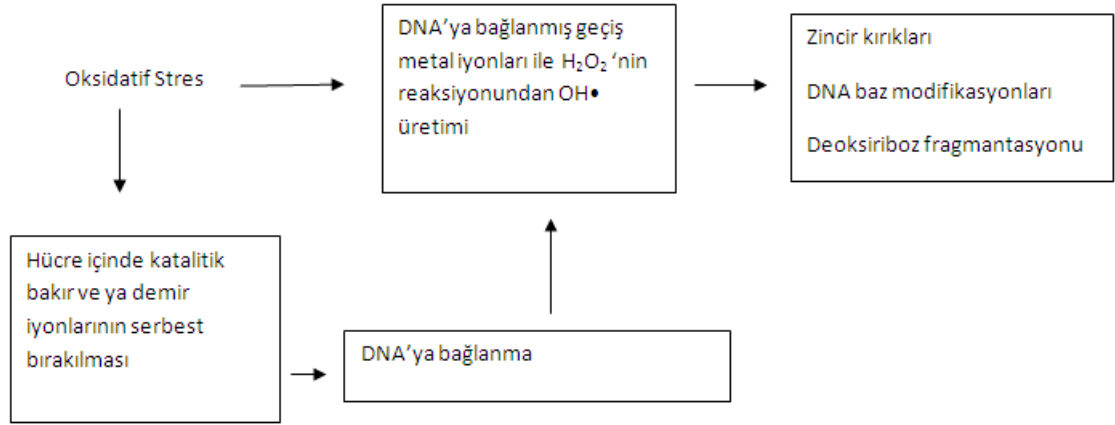
2.3.2.Oksidatif DNA Hasarını Açıklayan Hipotezler

DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır.

Fenton Kimyası hipotezinde $\text{OH}\cdot$ radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur. $\text{OH}\cdot$ radikalının DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan $\text{OH}\cdot$ radikallerinin hücre içinde girerek çekirdeğe geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma, membranı kolayca geçebilen H_2O_2 'in çekirdekte Fe-Cu iyonları ile reaksiyona girerek (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır [17, 30].



1 ve 2 numaralı reaksiyonlar demir/bakır katalizli Haber-Weiss reaksiyonları; 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar ise Fenton reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır [12,18].

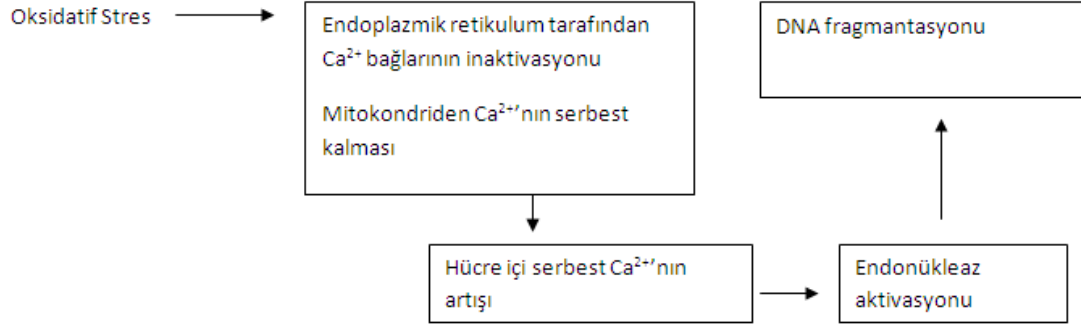


Şekil 2.4: DNA hasarını açıklayan Fenton Kimyası hipotezi

Hidroksil kaynağı olarak, bugüne kadar en büyük ilgi Fenton kimyası üzerinde olmuştur. DNA geçiş metalleri için güçlü bir kelatlama ajanıdır, ancak oksidatif stres hücre içi demir ve bakır iyonlarının sonradan DNA'ya bağlanabilen formlarına serbest kalmasına neden olabilir. Böylece $O_2^{\bullet-}$ ferritinden ve H_2O_2 hem proteinden demiri serbest bırakırken, $ONOO^-$ seruloplazminden bakırı serbest bırakır.

Hücredeki DNA-bağımlı bakır iyonları ROS ve elektrofilik fenolik ara ürünler üretmek için fenolik bileşiklerle reaksiyona girer. Bu etkileşim DNA bazlarına fenol katkıları, zincir kırıkları ve baz modifikasyonları içeren bir dizi DNA lezyonlarına sebep olur, ki bu lezyonlar belirli fenolik bileşiklerin karsinogenitesine katkı sağlarlar. Bakır iyonları varlığında DNA hasarına sebep olan fenolik bileşikler 2-hidroksioestrol, 2-metoksioestrol, dietilstilboestrol, bütillenmiş hidroksitolüen, bütillenmiş hidroksianisol, L-DOPA, dopamin, ferulik asit ve kafeik asidi içerir. Bununla birlikte, fenoller in vitro olarak kullanılan sisteme bağlı olarak karmaşık pro- ve anti-oksidan etkiye sahiptirler, ve sıklıkla bunların net etkilerini in vivo olarak tahmin etmek zordur. Örneğin, birçok sentetik ve diyet polifenoller (kuarsetin, kateşin, gallik asit esterleri ve kafeik asit esterleri dahil olmak üzere) H_2O_2 gibi peroksitler tarafından kaynaklı sitotoksiteden memeli ve bakteriyel hücreleri koruyabilir [1].

Doku kültür ortamının Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyon konsantrasyonunun artırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir kelatlayıcılarının kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği görülmüştür [12,18].



Şekil 2.5: DNA hasarını açıklayan Nükleaz Aktivasyonu hipotezi

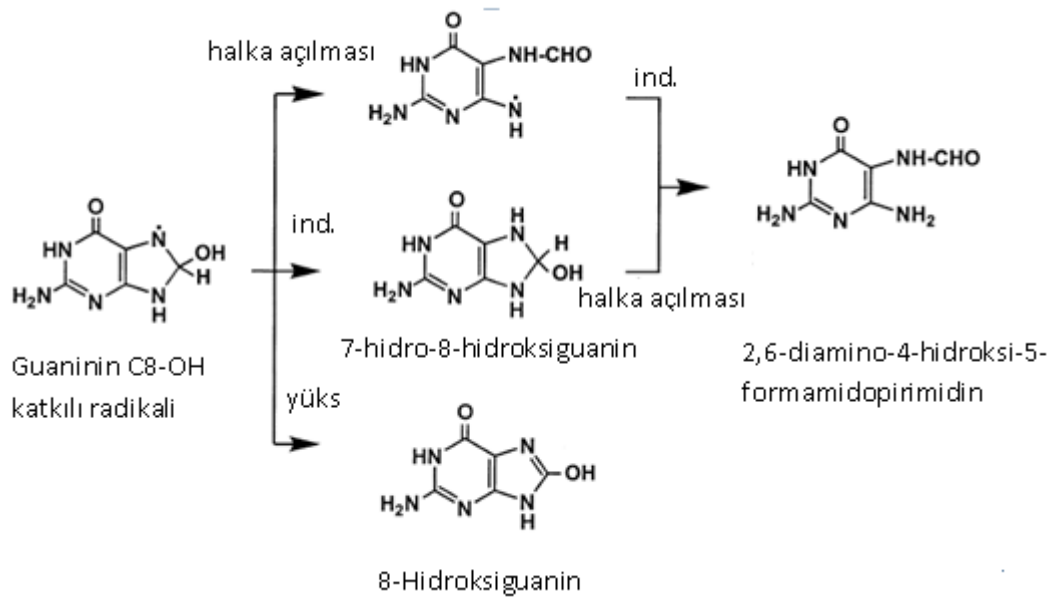
Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre; oksidatif stres, sitozolik Ca^{2+} iyon derişimi büyük bir artışa neden olarak çekirdekteki Ca^{2+} bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır.

Vücutta her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Geçiş metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir [30]. DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir [12].

2.3.3.Oksidatif DNA Hasarı Ürünleri Oluşum Mekanizması

Hidroksil radikalleri timin ve sitozinin C5 ve C6 pozisyonlarına etkiyerek C5-OH ve C6-OH katkılı radikalleri üretirler. Sitozin ve timinin C5-OH katkılı radikallerinin oksidasyon reaksiyonları, hidroksil radikalinin eklenmesini takip eder. Oksijen C5-OH katkılı radikallere eklenerek, 5-hidroksi-6-peroksil radikallerini verir, bu da su ile reaksiyonunu takiben (hidroksil radikali eklenmesi) O_2^- elimine edebilir ve sitozin glikol ve timin glikol oluşumuna yol açar. Timinin alil radikallerinin oksidasyonu 5-(hidroksimetil)urasil (5-OHMeUra) ve 5-formilurasil üretir. Oksijen yokluğunda, 5-

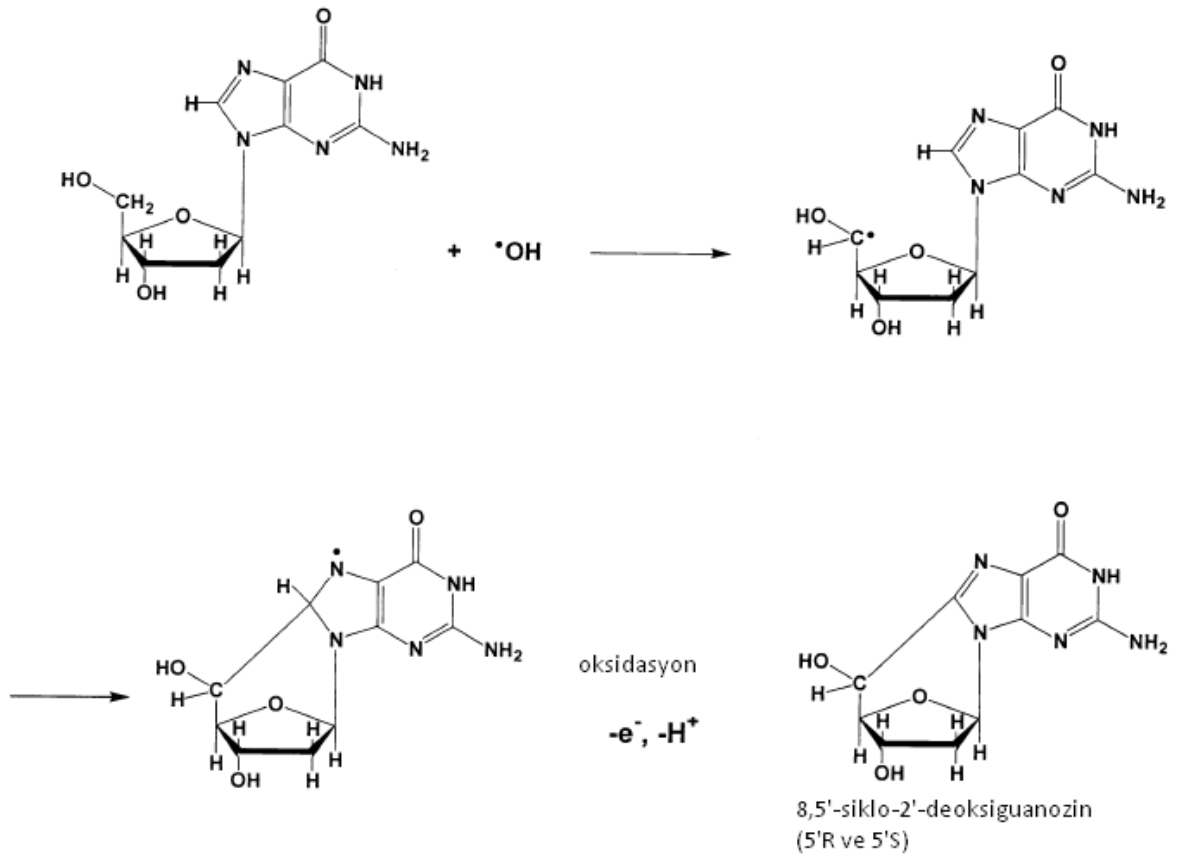
hidroksi-6-hidro ve 6-hidroksi-5-hidropirimidinler sırasıyla pirimidinlerin 5-OH ve 6-OH katkılı radikallerinin indirgenmesi ile oluşturulur. Sitozin ürünleri reaksiyon koşullarına bağlı olarak dehidrate ve deaminate olabilmeleri açısından tektirler. Böylelikle, sitozin glikol dehidrasyon ile 5-hidroksisitozin (5-OH-Cyt) ve deaminasyon ile urasil glikol ve deaminasyon ve dehidrasyon ile 5-hidroksiurasil (5-OH-Ura) verir [5].



Şekil 2.6: C8-OH katkılı radikalden guanin ürünlerinin oluşumunun mekanizması

Hidroksil radikalleri, C4-OH-, C5-OH-, C8-OH- katkılı radikaller vermek için pürinlere eklenirler. C4-OH- ve C5-OH- katkılı radikaller dehidrasyona uğrarlar ve oksidize pürin (-H) radikaller verir. C8-OH- katkılı radikallerin tek-elektron oksidasyonu ve tek-elektron redüksiyonu sırasıyla 8-hidroksipürinlerin ve (7,8-dihidro-8-oksopürin) ve formamidopirimidinlerin oluşumuna yol açar. Şekil 2.6'de 8-hidroksiguanin (7,8-dihidro-8-oksoguanin) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua)'nın oluşum mekanizmasını gösterir. Adenin için benzer reaksiyonlar 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde) verir. Bu ürünlerin her ikisinde, oksijenin varlığında ve yokluğunda oluşturulur. İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin verimini arttırırken, 8-hidroksipürinlerin oluşumu oksijen varlığında tercih edilir.

Şekil 2,7’de 2’deoksiguanozin durumunda moleküller arası siklizasyonun mekanizması gösterilmiştir. Bu reaksiyon oksijenin moleküller arası siklizasyondan önce C5’-merkezli şeker radikali ile difüzyon kontrollü reaksiyonu nedeniyle oksijen tarafından inhibe edilir. Reaksiyon esnasında önce OH• eklenir ardından 1 hidrojen ve 1 elektron kaybederek ürün oluşur.

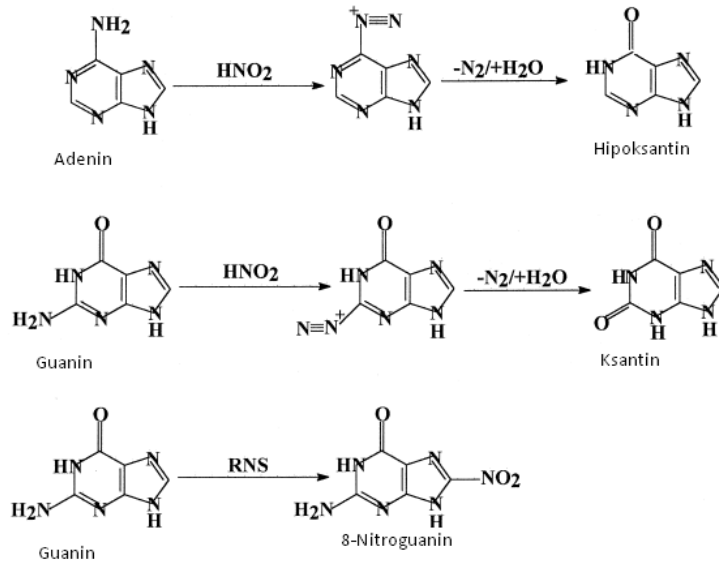


Şekil 2.7: 8,5'-cdGuo'nun oluşum mekanizması

DNA-protein çapraz bağlanmalar serbest radikal reaksiyonlar tarafından oluşturulur. Timin-tirozin çapraz bağlanması memeli kromatininde in vitro olarak tanımlanmıştır. Bu DNA-protein çapraz bağlanma mekanizması timinin alil radikalının tirozin halkasının C3-pozisyonuna eklenmesi şeklinde açıklanmıştır. Diğer hidroksil radikal kaynaklı DNA-protein çapraz bağlanma tipleri memeli kromatininde tanımlanmıştır [5,16].

Azot vücuda, nitratlar, nitritler, peptidler, proteinler ve aminoasitler olarak alınır ve bunların metabolitleri nitrik oksidi içerir. Nitrik oksit reaktif tür olmasına rağmen DNA 'ya direkt olarak saldırıamaz. Buna karşılık N_2O , HNO_2 ve $ONOO^-$ DNA'yı nitrate ve deaminate edebilir ve zincir kırıkları ile mutasyona sebep olur. Örneğin, adeninin hipoksantine deaminasyonu geçişlerle sonuçlanırken ($AT \rightarrow GC$), ki hipoksantin sitozin ile eşleşebildiği için, $ONOO^-$ $G \rightarrow T$ dönüşümüne neden olur.

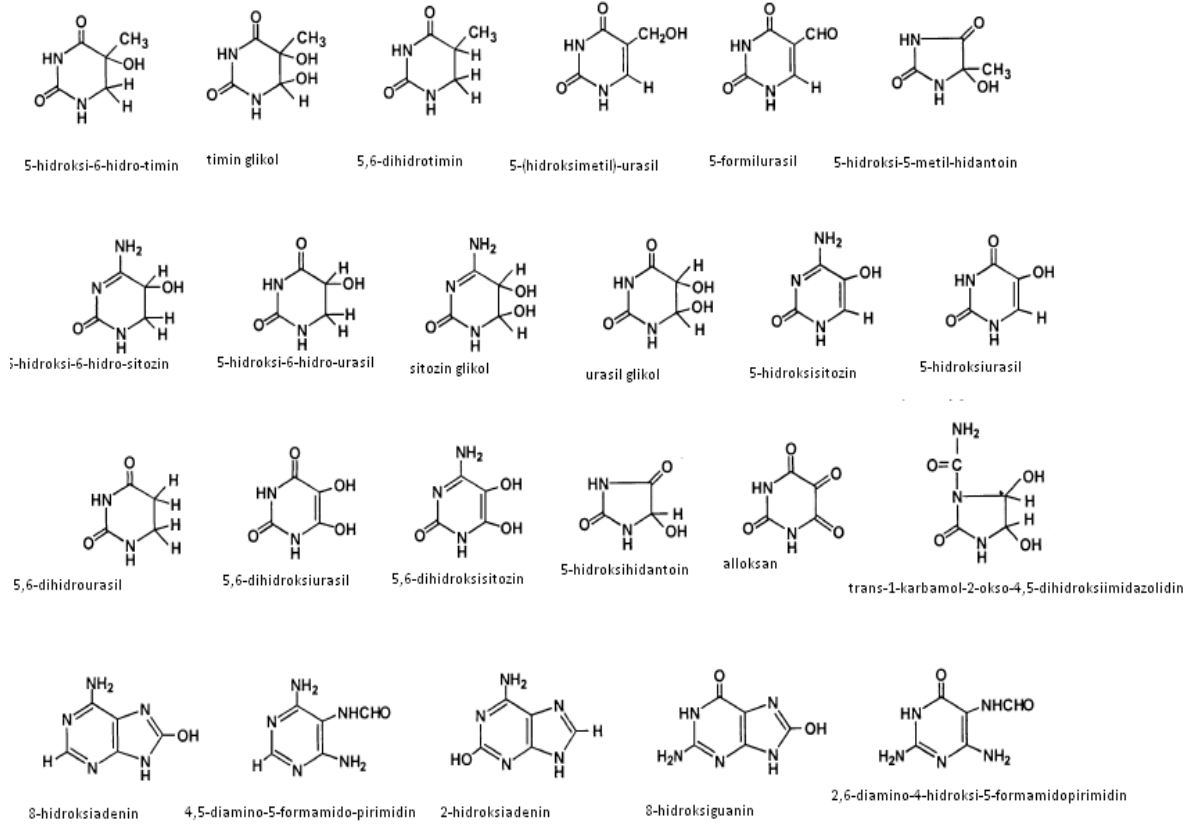
RNS'lerin adenin ve guanin bazlarında meydana getirdiği bir takım deaminasyon ve nitrasyon reaksiyonları Şekil 2.8'da verilmiştir [16].



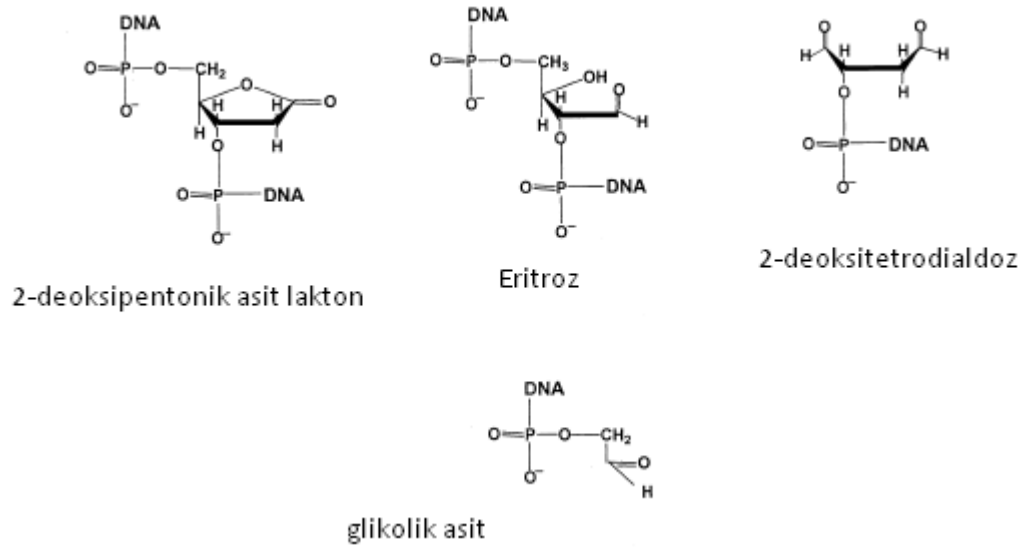
Şekil 2.8: DNA'da pürin bazlarının deaminasyon ve nitrasyonu

2.3.4. DNA Hasarı Ürünleri

Hidroksil radikalleri, çeşitli mekanizmalar ile DNA 'da çeşitli ürünlere sebep olurlar. Şekil 2.9'da DNA'da oluşan esas modifiye bazlar gösterilmiştir. Hidroksil radikalleri DNA'nın şeker parçası ile de reaksiyona girerler. Şekil 2.10, GC/MS kullanılarak DNA'da tanımlanan bazı esas şeker ürünlerini göstermektedir[5,16].



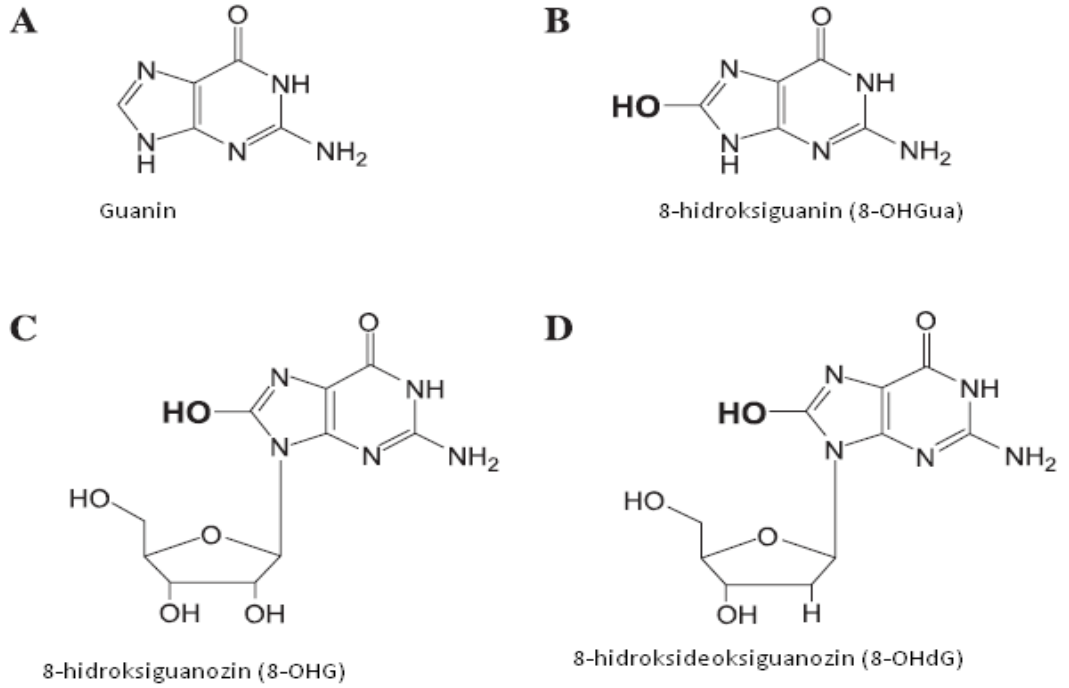
Şekil 2.9: DNA’da tanımlanmış serbest radikal kaynaklı bazı heterosiklik modifiye bazlar



Şekil 2.10: DNA’da tanımlanmış serbest radikal kaynaklı bazı şeker parçası ürünler

Tüm pürin ve piridin bazları arasında, oksidasyona en eğilimli baz guanindir [3]. Bunun nedeni guaninin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olması ve oksidasyona en yatkın olan baz olmasıdır [31]. Birçok karbohidrat gibi 2-deoksiriboz da Fe^{2+} bağlama özelliğine sahip olduğundan Fenton reaksiyonu ile oluşan

OH• radikallerinden özellikle etkilenmektedir. Buna karşın Cu^{2+} iyonları özellikle DNA'nın guanin-sitozine zengin bölgelerine bağlanır ve guaninin H_2O_2 ile reaksiyonlaşması sonucunda guanin baz hasarı oluşmaktadır [18]. Bu nedenle oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir ve en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OHdG olup oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul edilir [19]. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir (Şekil 2.11). DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır. Oksidatif hasarlı nükleosidler DNA'da yaşla birlikte birikir [3,31].



Şekil 2.11: 8-OHdG ve analoglarının kimyasal yapıları : (A) modifiye olmamış guanin bazı yapısı; (B) oksitlenmiş baz yapısı; (C) RNA'dan türeyen 8-OHdG analogunun yapısı; (D) DNA'dan türeyen 8-OHdG'nin yapısı

Ana oksidize nükleosid, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) olup, 8-oksodG de literatürde kullanılmaktadır. 8-OHdG, DNA'nın oksidize ürünü iken, 8-OHG RNA'nın ürünüdür. 8-OHGua, serbest guanin bazının oksidize ürünü iken, 8-OHG 8-hidroksi-2'-guanozini temsil eder ve RNA'dan oksidize nükleosiddir.

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), 8-okso-2'-deoksiguanozin (oxo8dG), 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksiguanozin(8-oxo-dG) ve 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin aynı ürünü temsil ederken, 8-okso-guanin, 8-oksoG, 8-hidroksiguanin, 7,8-dihidro-8-okso-guanin ve 7-okso-7,8-dihidroguanin aynı serbest oksidize bazdır [3].

8-OHdG'nin oksidatif DNA hasarının temel formu ve hücrel oksidatif stresin önemli belirtici olduğu şüphesizdir. Bununla birlikte, farklı DNA hasarı formlarının oksijen radikalleri ile üretildiği bilinen bir gerçektir. Bunların arasında, 5-hidroksi-2'-sitozin oksidatif DNA hasarının ilginç bir formudur. Çünkü yüksek sıklıkla CG→TA mutasyonlarını indüklediği bilinmektedir ve bu HPLC-ECD ile dedekte edilebilir.

2-hidroksi-2'-deoksiadenozin (2-OH-Ade), Fenton tipi reaksiyon ile üretilen diğer bir temel oksidatif hasar ürünlerinden biridir ve γ -radyasyonu ile üretilmemesi ilginç bir gerçektir. Bu esas olarak, nükleotit trifosfat formunda üretilir ve DNA'ya dahil edilir. DNA'da 2-OH-Ade, C, G ve A ile eşleşmemiş ve memeli hücrelerde ve E.coli'de önemli mutasyonları indüklemiştir. 2-OH-Ade'nin oluşumu oksijen indüklü mutagenезin önemli bir mekanizması olarak görülmesine rağmen, UV- ve EC-dedektör metodları hücresel DNA'da bunu dedekte edebilmek için yeterince duyarlı değildir. Bunu dedekte etmenin olası tek yolu, bunun için antikör hazırlamaktır.

DNA'da Fenton tipi reaktifler ile muamele edilerek glioksalın oluştuğu bulunmuştur. Glioksalın verimi 8-OH-dG'nin veriminden 20 kat yüksektir. Glioksal DNA'da üretildikten sonra, sıklık glioksal guanin oluşturmak için çevresindeki guanin parçasıyla kolayca reaksiyona girer.

5-Formildeoksiüridin (5-CHO-dU) γ -radyasyonlu DNA 'da dedekte edilmiş major DNA hasar ürünlerinden bir diğeridir. Nükleosid karışımı pH 7'de Fenton reaktifleri ile muamele edildiğinde (Fe^{+2} -EDTA- O_2 gibi) bu ürünün oluşma verimi 8-OHdG'den daha yüksektir [4].

HPLC-MS/MS uygulaması, gama ışınlarına maruz bırakılan neoplastik insan monositlerinin DNA'sında 9 oksidize nükleosidin tespitine olanak vermiştir. Bunlar, 8-oksodGuo, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiadenozin (8-oxodAdo), 5,6-dihidro-5,6-dihidrotimidine (ThdGly)'nin 4 cis ve trans diastreomerleri, 5-formil-2'-deoksiüridin (5-FordUrd), 5-(hidroksimetil)-2'-deoksiüridin (HmdUrd), ve 5-hidroksi-2'-deoksiüridin (5-OHdUrd)'dir. FapyGua ve FapyAde olarak adlandırılan diğer 2 bozunma ürünü, ilgili 8-hidroksi-7,8-dihidropüril öncülerinin indirgenmesinden ortaya çıkar ve HPLC-MS/MS ile gözlenmiştir [32].

Oksidize nükleosidler ve bazlar gibi oksidatif DNA lezyonlarının onarım ürünleri suda çözünür ürünlerdir ve daha fazla metabolize olmadan dışarı atılırlar. 8-okso-2'-deoksiguanozin, 8-oksoguanin, timin glikol, timidin glikol ve 5-hidroksimetil urasil idrarda tanımlanmış bazı olası ürünlerdir. Şu da vurgulanmalıdır ki, idrardaki onarım ürünlerinin dışa atılması tüm vücuttaki hasarın ortalama oranını temsil eder [33].

2.3.5.8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin

Oksidatif hasarın bir belirteci olan ve sıklıkla üzerinde çalışılan 8-OHdG'nin buluşu ilk defa Kasai ve Nishimura tarafından 1984'te pişirilmiş gıdaların modeli olarak ısıtılmış glikozda mutajenleri izole etme ve çalışma girişimlerinde bildirilmiştir. Aynı yazarlar serbest oksijen radikallerinin C-8 oksidasyon reaksiyonlarında yer aldıklarını bulmuşlardır. Takip eden yıllarda 8-OHdG'nin asbest lifleri ve H₂O₂ gibi serbest oksijen radikali üreten riskler veya reaksiyonlar altında oluşumu doğrulanmıştır.

1986'da, Floyd ve arkadaşları hücrel DNA'da 8-OHdG'nin tayini için elektrokimyasal dedektör ile HPLC kullanarak (HPLC-EC) analitik bir metod geliştirmişler. Bu metod daha sonradan DNA'nın çeşitli analitik çalışmaları için farklı gruplar tarafından kullanılmıştır.

Deney hayvanlarının idrarında DNA'nın major oksidasyon ürünü olarak 8-OHdG analizinin ilk bildirimi 1989 yılında olmuştur. Analiz yöntemlerinde iki yaklaşım mevcuttur.

1. Doğrudan yaklaşım; fiziksel ve kimyasal metotlar kullanarak DNA lezyonun ayırmak ve DNA ekstraksiyonu ve hidrolizini yapmak
2. Dolaylı yaklaşım; bütün DNA yapısının korunması ve lezyonların oluşumunun yerinde izlenmesidir.

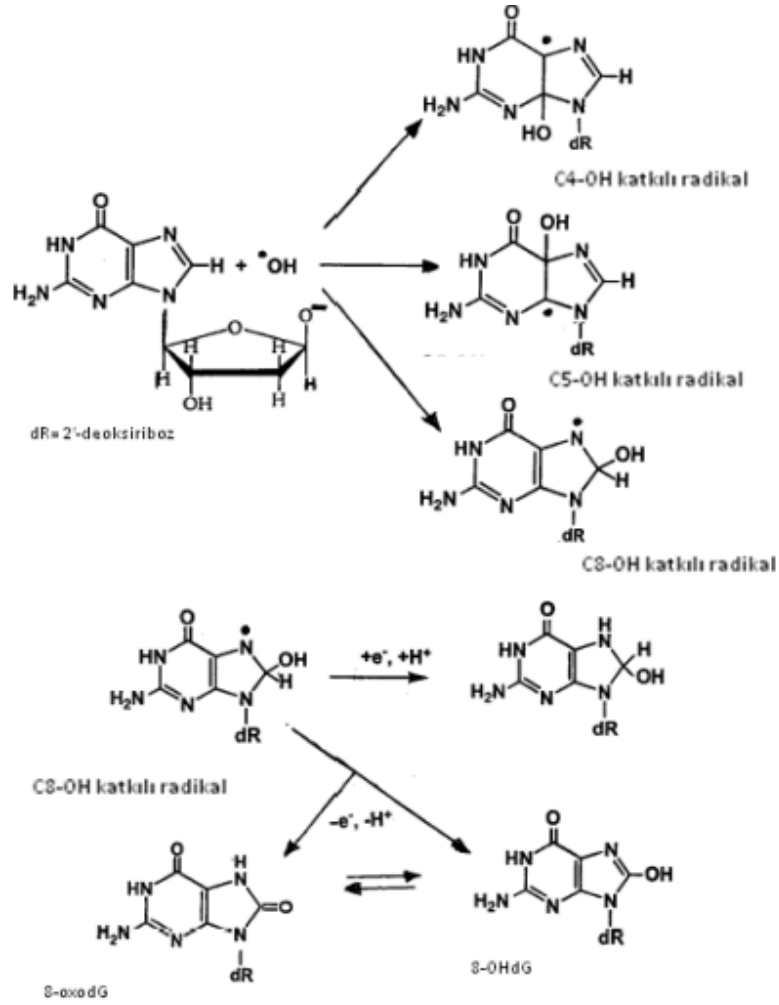
İlk yaklaşımda, elektrokimyasal dedeksiyonlu HPLC (HPLC-EC), GC-MS ile miktar tayinini yapılmasıdır. İkinci yaklaşımda ise, özel DNA onarım enzimlerinin kesim aktivitesi aracılığıyla ölçümler yapılır. Ayrıca, formamidoprimidin DNA N-glikosilaz enzimi kullanılarak, 8-oksodG iplik kırılmasına dönüştürülür ve iplik kırıklarının miktarı comet test yöntemi veya alkali elüsyon tekniği ile değerlendirmesi yapılır.

Benzer şekilde son yıllarda 8-OHdG ile ilgili olarak çok sayıda çalışma verilmiştir. Bu çalışmaların bir sonucu olarak, 8-OHdG dejeneratif hastalıkları içeren yaşlanma sürecinin, serbest oksijen radikallerinin mekanizması ile insanlara kanser riskinin ve

genel olarak beslenmenin etkisi ve yaşam tarzının biyolojik belirteci olarak oluşturulmuştur .

$\text{OH}\cdot$ 'nin guanin ile etkileşimi C8-hidroksiguanin (8-OHGua) veya bunun nükleosit formu olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin oluşumuna yol açar. Başlangıçta hidroksil radikali eklenme reaksiyonu radikal katkılarının üretimine yol açar, sonra bir elektron soyutlaması ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşur (Şekil 2.12). 8-OHdG keto-enol tautomerizme uğrar ve bu okside ürün olan 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG) lehinedir. Bilimsel literatürde 8-OHdG ve 8-oksodG aynı bileşik için kullanılabilir.

Diğer DNA nükleobazları da aynı şekilde hidroksil radikali ile reaksiyona girse de, 8-oxodG lezyonu en sık görülen lezyondur. Çünkü nispeten daha kolay oluşur ve promutajeniktir. Böylece kanser oluşumunun potansiyel biobelirtecidir [17].



Şekil 2.12: 2'-deoksiguanozinin hidroksil radikali ile reaksiyonu ve 8-OHdG ve bunun tautomer formunun oluşum mekanizması

Fenton tipi reaktifler (Fe^{2+} -EDTA-askorbik asit- O_2 ; Fe^{3+} -EDTA-polifenol- H_2O_2), X-ışınları, sigara dumanı, asbest + H_2O_2 oto-oksidize doymamış yağ asidi, dizel egzoz parçacıkları gibi birçok oksijen radikal üretici ajanlar DNA 'da veya dG'den 8-OH-dG üretimini kolaylaştırır. Oksijen radikallerine ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}_2^-$) ek olarak, 8-OHdG singlet oksijen, (metilen mavisi + ışık), guanin radikal katyon (riboflavin + ışık) ve 7-allil-guanin hidrasyonu gibi diğer mekanizmalar ile de üretilir. Nitrik oksit ve süperoksit reaksiyonu ile üretilen peroksinitrit DNA'da 8-OHdG'nin oluşumu için etkilidir. Bu sonuçlar 8-OHdG'nin çeşitli ajanlar ile oluştuğunu ortaya koyar [4].

Deoksiguanozinin (dGuo) C-8 pozisyonu askorbik asit ile 37°C'de pH 6.8'de O_2 varlığında hidroksile olur. H_2O_2 'nun ilave edilmesi ile bu hidroksilasyonu önemli

derecede arttırmıştır. Bu sistem (Fe^{+2} -EDTA- O_2) dGuo'nun yüksek verimde hidroksilasyonunda yeterlidir. DNA'daki guanin kalıntıları da, askorbik asit ile hidroksile edilebilir. Hidroksilamin, hidrazin, dihidroksimaleik asit, sodyum bisülfid ve aseton gibi diğer indirgeyici ajanlar da metal-EDTA kompleksleri kadar hidroksilasyon reaksiyonu için etkilidir. 8-OH-dG'nin diğer indirgeyici ajanlar ile oluşması araştırılmış, bu amaçla hidroksilamin, hidrazin, dihidroksimaleik asit, sodyum bisülfid ve aseton gibi çeşitli ajanların hidroksilasyon için etkili olduğu görülmüştür. Hidroksilamin, hidrazin ve dihidroksimaleik maleik asidin askorbik asitten daha güçlü hidroksilasyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca hidroksilasyonun Fe (II), Sn (II) , Ti (III) veya Cu (II) EDTA kolpleksleri ile 37°C'de gerçekleştiği ve bu metal komplekslerinin aromatik bileşiklerin hidroksilasyonu için etkili olduğu ve en yüksek verimin Fe-EDTA ile olduğu gözlenmiştir [34].

2.3.6.Oksidatif DNA Hasarının Ölçülmesi

Oksidatif DNA hasarı klinik olarak oldukça önemlidir. Bu alanda yapılan çeşitli çalışmalar oksidatif DNA hasarının kanser, koroner kalp hastalıkları ve diyabet gibi yaşlanma ile ilgili çeşitli hastalıklarla bağlantılı olduğunu göstermiştir [3]. Geçmişte oksidatif DNA hasarının ölçümü için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bunlar immünokimyasal teknikler, comet testi, elektrokimyasal dedektör ile (ECD) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC),GC/MS, LC/MS ve LC/MS/MS 'dir.

Bu tekniklerin her birinin avantaj ve dezavantajları vardır. Özellikle bu teknikler herhangi spektroskopik kanıt olmaksızın yalnızca bir ürünü ölçer. Kütle spektrometriyi kullanan bu teknikler DNA hasarının tartışmasız kantitatif belirlenmesi ve tanımlanmasını sağlar. Genel olarak, MS kullanımı olmayan teknikler, DNA'da serbest radikaller ile üretilen çok fazla ürün arasından yalnızca bir tek ürünün ölçümünü sağlar. Dahası, hiçbir yapısal kanıt sunmaz. Bunlardan en fazla kullanılanlardan biri ECD - HPLC'dir.

Oksidatif DNA Hasarı Avrupa Standartları Komitesi tarafından yapılan son çalışmalar ve diğer çalışmalar çeşitli laboratuarlarda ölçülen 8-OH-Gua ve 8-OHdG'nin seviyelerinde önemli farklılıklar göstermiştir. Sonuçlar 8-OH-Gua ve 8-OHdG'nin ölçümünün laboratuvar ve kullanılan tekniğe bağlı olabileceğini ve bu bileşiğin

ölçümünde çeşitli laboratuvarlar arasında görüş birliği olmadığını ileri sürmüştür. GC/MS, LC/MS ve LC/MS/MS gibi kromatografik ve spektrometrik tekniklerin kombine kullanımı sadece pozitif tanımlama ve kesin kantitasyon değil, ayrıca birçok ürünün eş zamanlı ölçümünü sağlar [4]. Mutajenik özelliklerinden dolayı çalışmalar 8-OHdG üzerine yoğunlaşmıştır. Son yıllarda 8-OHdG lezyonları HPLC, GC-MS ve LC-MS-MS ve iminohistokimyasal metodlar ve tek hücre jel elektroforezi ile yüksek duyarlılıkla tespit ve analiz edilebilmiştir. 8-OHdG 'nin tespit ve analizi hayvan organ ve insan örneklerinde (idrar, insan organları, lökosit DNA) oksidatif stres, yaşlanma ve karsinogenezin biyomarkeri olarak çalışılabilir [17].

Uzun zamandır, GC/MS hücrelerde DNA çarpaz bağlanmalarını ve DNA baz ve şeker lezyonlarının ölçümü için kullanılmıştır. Son zamanlarda, LC/MS ve LC/MS/MS DNA'da modifiye nükleotitlerin ölçümü için yeni teknikler olarak ortaya çıkmıştır. LC/MS/MS ilk defa, yalnızca 8OH-dG'nin ölçümü için kullanılmış, ardından diğer bazı modifiye nükleotitler için de kullanılmıştır. LC/MS son zamanlarda, 8-OHdG, (5'R)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin [(5'R)-8,'-cdAdo], (5'S)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin [(5'S)-8,5'-cdAdo]], 8-hidroksi-2'-deoksiadenozin(8-OH-dAdo), (5'R)-8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin[(5'R)-8,5'-cdGuo], ve (5'S)-8,5'-siklo-2'-deoksiguanozin [(5'S)- 8,5'-cdGuo)]'nin ölçümü için uygulanmıştır [5].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal madde ve örnekleri tartmak için Radwag AS 220/C/2 hassas terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic marka ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Wisemix VM-10 girdap karıştırıcı, distile su üretimi için GFL 2008 su sistemi, Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, santrifüj işlemleri için Elektromag (M 4812 P) marka santrifüj cihazı, inkübasyon işlemleri için Memmert su banyosu ve ısıtma işlemleri için Wisd MSH-20A ısıtıcı kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler;(calf thymus) deoksiribonükleik asit sodyum tuzu, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin) hidroklorür (Nc), amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), sodyum karbonat (Na_2CO_3), disodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu, amonyum demir (II) sülfat heksahidrat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), H_2O_2 (%30'luk), hidroklorik asit (HCl), sodyum klorür (NaCl), demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), trikloroasetik asit (TCA), 2-tiyobarbitürik asit (TBA), etanol (EtOH), metanol, aseton, asetonitril, dimetilsülfoksit, tetrahidrofuran, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonyum tuzu (ABTS), potasyum persülfat, dipotasyum monohidrojen fosfat K_2HPO_4 , potasyum dihidrojen fosfat KH_2PO_4 sodyum hidroksit (NaOH), glutatyon (GSH), askorbik asit, L-sistein ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) ve gallik asit.

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Çözeltisi

DNA (Calf Thymus), konsantrasyonu 2 mg mL^{-1} olacak şekilde tartılıp su ile bir deney tüpü içerisinde girdap karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandı.

3.3.2. Antioksidan Çözeltileri

Glutatyon (GSH) ve askorbik asidin (AA) $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 'lık stok çözeltileri ve gallik asidin $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 'lık stok çözeltisi için gerekli miktarlar tartılıp su ile hazırlandı. Sistein'in $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 'lık stok çözeltisi için gereken miktar tartılıp, 0,5 mL 1 M HCl ile çözüldü ve 25 mL'ye saf suyla tamamlanarak hazırlandı. Çalışma çözeltileri için stok çözeltiden uygun oranda alınan hacim destile su ile seyreltildi.

3.3.3. Modifiye CUPRAC Reaktif Çözeltileri

3.3.3.1. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi

Gerekli miktar $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ su ile çözüldü hacim 100 mL'ye tamamlanarak $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.3.3.2. Neokuproin Çözeltisi

Neokuproin (Nc) için gereken miktar tartılıp, EtOH ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı, $7.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.3.3.3. Amonyum Asetat Çözeltisi

Amonyum asetat (NH_4Ac) için gereken miktar tartılarak saf su ile çözüldü, (pH=7.0) 250 mL olacak şekilde 1 M konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.3.3.4. Sodyum Karbonat Çözeltisi

%0,5'lik (w/v) çözelti hazırlamak için 0,5 gram Na_2CO_3 100 mL su içinde çözüldü.

3.3.3.5. pH 7.0 Fosfat Tamponu Çözeltisi

0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

3.3.3.6. Disodyum Etilendiamin Tetraaseteik Asit (EDTA) Çözeltisi

$2 \times 10^{-2} \text{ M}$ çözelti için 0,37224 g tartılıp, su ile çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.

3.3.3.7. Amonyum Demir (II) Sülfat ($(NH_4)_2Fe(SO_4).6H_2O$) Çözeltisi

Amonyum demir (II) sülfat 2×10^{-2} M olacak şekilde 0,1960 g tartılıp 1.0 mL 1 M HCl ile çözülüp saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.3.8. Hidrojen Peroksit Çözeltisi

%30'luk stok peroksit çözeltisi önce 0,1 M 'a seyreltildi ve ara stok çözeltisinden 10 mM olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı.

3.3.3.9. HCl Çözeltisi

12 M HCl 'den uygun miktar alınıp su ile 1 M olacak şekilde seyreltildi.

3.3.3.10. NaCl Çözeltisi

2,5 M olacak şekilde 14,61 g tartılıp su ile çözülerek 100 mL 'ye tamamlandı.

3.3.4. TBARS Reaktif Çözeltileri

3.3.4.1. pH 7.4 Fosfat Tamponu Çözeltisi

0,2 M $Na_2HPO_4.H_2O$ ve 0,2 M $NaH_2PO_4.H_2O$ çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

3.3.4.2. Hidrojen Peroksit Çözeltisi

%30'luk stok peroksit çözeltisi önce 0,1 M 'a seyreltildi ve ara stok çözeltisinden 33.6 mM olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı.

3.3.4.3. Demir (III) klorür hekzahidrat ($FeCl_3.6H_2O$) Çözeltisi

0,0216 g tartılıp 1.0 mL 1 M HCl ile çözülüp saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.4.4. Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi

20 mM çözeltiden seyreltilerek 0,5 mM çözelti hazırlandı.

3.3.4.5. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi

Trikloroasetik asit 2,4508 g tartılıp 0,6 M olacak şekilde çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.6. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi

1,2613 g TBA 0,3 M NaOH ile çözülerek 0,35 M olacak şekilde çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.7. Askorbik asit (AA) Çözeltisi

0,0211 gramı su ile çözülüp, 10 mL'ye tamamlanarak 12 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.3.5. ABTS Reaktif Çözeltileri

3.3.5.1. ABTS / Persülfat Çözeltisi

7,0 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM $K_2S_2O_8$ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi 5mM PBS pH 7,4 tamponu ile seyreltildi.

3.3.5.2. PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi

100 mM 50 mL K_2HPO_4 çözeltisi üzerine 100 mM KH_2PO_4 çözeltisinden damla damla ekleyerek pH 7,4 e ayarlanıp içerisinde uygun miktarda alınıp 0,5 g NaCl ilave edilerek 5 mM' a destile suyla seyreltildi.

3.3.6.8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin Çözeltisi

1 mg 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin 2 mL suda çözülerek 1,76 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Orijinal CUPRAC Yöntemi [35]

Yapılan çalışmada DNA hasarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan standart bir madde olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)'e orijinal CUPRAC Yöntemi uygulandı. Bu işlem için bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL 8-OHdG çözeltisi eklenip son olarak hacim saf su ile 5.5 mL'ye tamamlanarak reaksiyon karışımı 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek reaktif körüne karşı 450 nm'de absorbanslar okundu. 8-OHdG $3,52 \times 10^{-4}$ M çalışma çözeltisinden 0,1-0,5 mL aralığında hacimler kullanıldı.

3.4.2. ABTS/Persülfat Yöntemi [36]

8-OHdG için CUPRAC Yöntemi dışında ABTS Yöntemi de uygulandı. Bu amaçla ABTS nin seyreltilmesinde biyolojik ortamlarda yaygın olarak kullanılan PBS tercih edildi. Deney tüpü içerisine x mL 8-OHdG çözeltisi konulup hacim PBS 5 mM pH 7.4 tamponu ile 1 mL'ye tamamlandı. Üzerine PBS ile seyreltilmiş ABTS/persülfat çözeltisinden 2 mL ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 6 dakika oda sıcaklığında

bekletildi ve absorbans PBS'ye karşı 734 nm'de ölçüldü. 8-OHdG $1,72 \times 10^{-4}$ M çalışma çözeltisinden 0,1-0,5 mL aralığında hacimler kullanıldı.

3.4.3. DNA'nın Oksidatif Hasarının Belirlenmesinde Kullanılan Modifiye CUPRAC Metodu

Bir deney tüpüne sırasıyla 1,5 ml 0,2 M pH 7.0 fosfat tamponu, 0,5 ml 2 mg mL^{-1} deoksiribonükleik asit çözeltisi, 0,25 ml 20 mM EDTA, 0,25 mL 20 mM amonyum demir (II) sülfat, 1,5 mL su ve 1 mL hidrojen peroksit çözeltisi eklenip tüplerin ağzı kapatılarak su banyosunda 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak için 1 M HCl çözeltisinden 0,5 mL ve 2,5 M NaCl çözeltisinden 1 mL ilave edilip, vortekslendi. Buradan alınan 0,5 mL'lik örnek için CUPRAC yöntemi aşağıdaki şekilde uygulandı: 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi, 2 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi bu sıra ile karıştırıldı ardından ortama 0,5 ml %0,5 Na_2CO_3 ilave edildi. Son olarak inkübasyon çözeltisinden 0,5 mL alınarak CUPRAC karışımına katıldı. Reaktif körünün hazırlanması amacıyla içinde DNA hariç tüm diğer reaktifleri içerecek şekilde hazırlanan çözelti 37°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildi, ortama 0,5 mL 1 M HCl ve 1 mL 2,5 M NaCl eklendi buradan alınan 0,5 mL lik kısım yukarıda belirtilen CUPRAC reaktiflerini içeren çözeltiye eklendi, denemelerde referans olarak kullanıldı. 5 dakikanın sonunda absorbans referansa karşı 450 nm dalgaboyunda okundu.

3.4.3.1. Optimum H_2O_2 miktarının Belirlenmesi

DNA'nın oksidatif hasarı ile oluşan ürünlerin Modifiye CUPRAC yöntemiyle belirlenmesinde kullanılan yöntem için en uygun H_2O_2 miktarının belirlenmesi amacıyla 10 mM H_2O_2 den alınan 0,5; 0,75; 1,0 mL lik kısımlar ile yöntem literatürde verilen yöntem [8] benzer şekilde uygulandı ancak işlemin yapılışı sırasında ortama katalaz eklenmedi.

Ayrıca CUPRAC yönteminde reaksiyon verdiği bilinen H_2O_2 in Fenton reaksiyonu sonucunda tükenip tükenmediği ve CUPRAC yönteminde herhangi bir girişime neden olup olmayacağı araştırıldı. Bu amaçla DNA içermeyen bir reaksiyon karışımı

hazırlanarak yöntem 3.4.3 de anlatılan şekilde uygulandı. Buradan elde edilen sonuçlar aynı derişiminde H_2O_2 in CUPRAC absorbansı ile karşılaştırıldı.

3.4.3.2. Katalaz Etkisinin İncelenmesi

Modifiye CUPRAC Yöntemi [8] literatürde verilen yönteme benzer şekilde yapıldı ancak farklı olarak H_2O_2 miktarı 0,5 mL den 1 mL ye çıkartıldı. Uygulama sırasında eklenen katalazın CUPRAC absorbansında oldukça düşük sonuçlara neden olduğu görüldü. Bu nedenle uygun katalaz miktarı araştırıldı. Bu amaçla 25-300 U mL^{-1} arasında değişen derişimlerinde hazırlanan katalaz çözeltisinden alınan 0,5 mL lik kısımlar ile işlem anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve CUPRAC absorbansları 450 nm de okundu.

Ayrıca katalaz varlığının reaksiyonu durdurup durdurmadığının incelenmesi amacıyla 25 U mL^{-1} katalazdan alınan 0,5 mL'lik kısımlar inkübasyon çözeltisine belirtildiği şekilde katıldıktan sonra bu çözeltiden başlangıçta, 5. 10. ve 20. dakikalarda alınan 0,5 mL lik kısımlara CUPRAC yöntemi uygulandı absorpsiyon spektrumları kaydedildi.

3.4.3.3. Reaksiyonun Durdurulması

Fenton yöntemiyle elde edilen hidroksil radikalleri tarafından DNA'nın parçalanması amacıyla gerçekleştirilen reaksiyonun durdurulması için 37°C de 10 dakika süresince gerçekleştirilen inkübasyon sürecinin sonunda ortama 0,5 mL 1 M HCl ve 1 mL 2,5 M NaCl eklendi. (1 M 0,5 ml) HCl + (2,5 M 1 mL) NaCl içeren çözeltiden başlangıçta, 5. 15. ve 30. dakikalarda alınan 0,5 mL lik kısımlara CUPRAC yöntemi uygulanarak absorbanslar karşılaştırıldı.

Burada DNA'nın protein yapısından dolayı katılan HCl in bulanıklığa sebep olduğu görüldü. Ancak buradan alınan örnekler CUPRAC yönteminde herhangi bir bulanıklığa neden olmadı. Bu nedenle CUPRAC yöntemi uygulanmadan önce santrifüj işleminin gerekli olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla santrifüj edilmiş ve edilmemiş iki gruba deneyler uygulanarak sonuçlar karşılaştırıldı.

Ayrıca yöntem TBARS yöntemi ile uyumlu olacak şekilde reaksiyonu durdurmak için 0,6 M TCA eklenerek denendi. Bu amaçla inkübasyon çözeltisine 0,6 M TCA çözeltisinden 0,5 mL ilave edildi. Sonuç HCl-NaCl ile yapılan CUPRAC absorbansı ile karşılaştırıldı.

3.4.3.4. Çözücü Etkisi

Yöntem üzerine etanol başta olmak üzere antioksidanlar ile yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan tetrahidrofuran (THF), dimetilsülfoksit (DMSO), asetonitril, aseton ve metanolün etkileri incelendi. Etanolün varlığının sistemde girişime neden olması nedeniyle antioksidanın minimum çözücü ile çözüldüğü varsayılarak seyrelmiş çözücüler ile yöntem Bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı gibi uygulandı. Tek başına çözücülerin verdiği absorbanslar Tablo 4.3'de verildi. Bu işlemin ardından farklı oranlarda seyreltilmiş çözücüler DNA'lı ve DNA'sız olarak iki gruba uygulandı. Bu amaçla bir deney tüpüne 1,5 mL 0,2 M pH 7,0 fosfat tamponu, 0,5 mL DNA (DNA'sız grup için bu sıraya su konuldu), 0,25 mL 20 mM EDTA, 0,25 mL 20 mM amonyum demir (II) sülfat, (1,5-x) mL saf su ve x mL çözücü eklendikten sonra 1 mL 10 mM H₂O₂ katılarak 10 dakika 37°C su banyosunda bekletildi (x=0,5 mL alındı). Bu sürenin sonunda 0,5 mL 1 M HCl ve 1 mL 2,5 M NaCl ilave edilerek modifiye CUPRAC uygulandı. Bir deney tüpüne 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi, 2 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi bu sıra ile karıştırıldı ardından ortama 0,5 ml %0,5 Na₂CO₃ ilave edildi. Son olarak inkübasyon çözeltisinden 0,5 mL alınarak CUPRAC karışımına katıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler CUPRAC reaktif körüne karşı absorbanslar 450 nm'de okundu (Tablo 4.4-4.6).

3.4.3.5. DNA Miktarı ile CUPRAC Absorbansları Arasındaki İlişki

Konsantrasyonu 2 mg mL⁻¹ olan stok DNA çözeltisi 0,1-1 mL arasında değişen farklı hacimlerde alınarak yöntem Bölüm 3.4.3 de anlatıldığı şekilde uygulandı. Yöntem ayrıca Fenton reaksiyonunun durdurulması için HCl-NaCl karışımı yerine bir diğer alternatif olarak denenen 0,5 mL 0,6 M TCA ilavesi ile de tekrarlandı. Her iki durum için DNA miktarı ile absorbans arasındaki ilişki incelendi.

3.4.3.6.Çeşitli Antioksidanların Varlığında Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi

Antioksidanların varlığının DNA'nın oksidatif hasarı üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla 5.0×10^{-3} M GSH dan alınan 0,2-1,0 mL; 2.0×10^{-3} M AA den alınan 0,2-0,8 mL; 1.0×10^{-3} M CYS den alınan 0,2-1,0 mL ve 1.0×10^{-3} M GA den alınan 0,1-0,5 mL lik kısımlar için yöntem 3.4.3 de anlatılan şekilde uygulandı. Uygulama sırasında 1,5 mL su yerine x mL antioksidan çözeltisi ve (1,5-x) mL su kullanılarak diğer işlemler aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.4.3.7.8-hidroksi-2'-deoksiguanozine Modifiye CUPRAC Şartlarının Uygulanması

Su banyosunda gerçekleştirilen inkübasyon işleminin ve DNA'nın oksidatif hasarı reaksiyonunun durdurulması amacıyla kullanılan HCl – NaCl karışımının 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin CUPRAC yöntemi ile tayinine etkisinin araştırılması amacıyla şartlar benzer şekilde düzenlenerek Modifiye CUPRAC Yöntemi uygulandı. Bu amaçla $3,5 \times 10^{-4}$ M 8-OHdG çözeltisi 10 dakika 37°C deki su banyosunda bekletildi. Bir deney tüpüne 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 2 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi bu sıra ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışım üzerine x mL ($x = 0,1 - 0,5$ mL arasında olacak şekilde) 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin ve 0,5-x mL saf su eklenerek bu karışım üzerine son konsantrasyonlar DNA ya uygulanan yöntemdekine eşit olacak şekilde HCl ve NaCl ve 0,5 mL %0,5 lik Na_2CO_3 eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen karışım 450 nm de reaktif körüne karşı okundu.

Reaksiyon karışımının absorbanları okunmadan önce orijinal CUPRAC Yönteminde 30 dakika oda sıcaklığında bekletilirken Modifiye CUPRAC Yönteminde bu süre 5 dakika olduğundan 8-OHdG örnekleri için absorbanlar 5. ve 30. dakikalarda okundu ve sonuçlar kıyaslandı.

3.4.4. DNA'nın Oksidatif Hasarının Ölçümünde Kullanılan TBARS Metodu [11]

Bir deney tüpüne sırasıyla 400 µL 0,2 M pH 7.4 fosfat tamponu, x µL 2 mg mL^{-1} DNA çözeltisi, 50 µL 33,6 mM peroksit çözeltisi, 75 µL 3,2 mM FeCl_3 , 100 µL 0,5 mM EDTA ve 50 µL 12 mM askorbik asit çözeltisi katılarak hacim 800 µL'ye 0,2 M fosfat tamponu ile tamamlandı ve 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. Ardından reaksiyonu durdurmak için 0,6 M TCA çözeltisinden 250 µL ilave edildi ve son olarak 0,35 M TBA

  zeltisinden 100  L katıldı. 15 dakika 100 C su banyosunda bekletildikten sonra 530 nm dalgaboyunda fosfat tamponuna karşı okundu. Ayrıca reaksiyonun durdurulması için TCA yerine CUPRAC yönteminde olduğu gibi HCl+NaCl kullanıldı. Bu işlem için inkübasyondan sonra 250  L 1 M HCl ve ardından 500  L 2,5 M NaCl ilave edildi, ve son olarak 0,35 M TBA çözeltisinden 100  L katıldı. 15 dakika 100 C su banyosunda bekletildikten sonra 530 nm dalgaboyunda fosfat tamponuna karşı okundu.

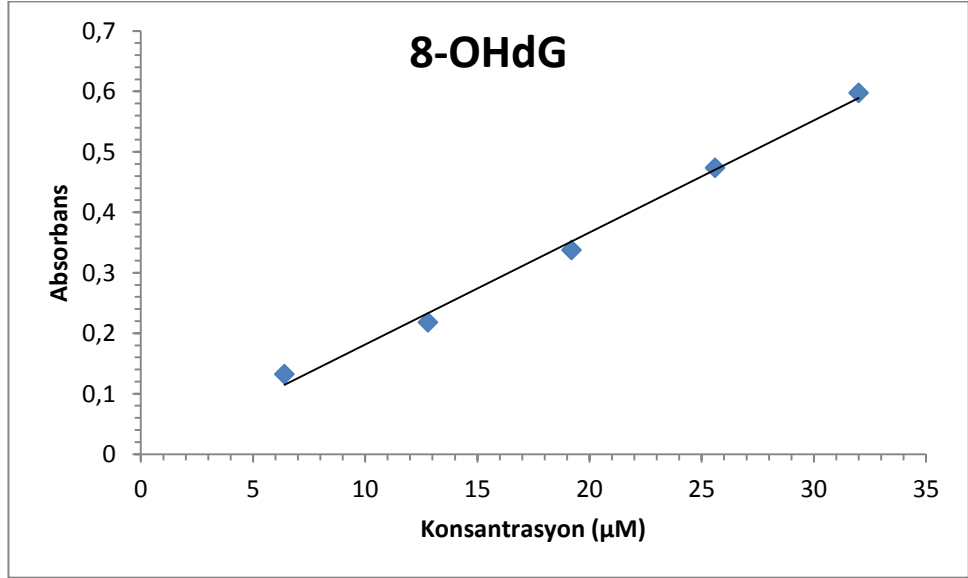
3.4.5. Yöntemler Arası Korelasyonun İncelenmesi

Yöntemler arasındaki korelasyonu incelenmesi amacıyla son konsantrasyonları aynı olacak şekilde DNA çözeltisinden alınan uygun hacimlere her iki yöntem uygulandı. CUPRAC Yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri x eksenine, TBARS yöntemi ile elde edilen absorbans değerleri y eksenine yerleştirilerek bir kalibrasyon doğrusu çizildi.

4. BULGULAR

4.1.CUPRAC YÖNTEMİ SONUÇLARI

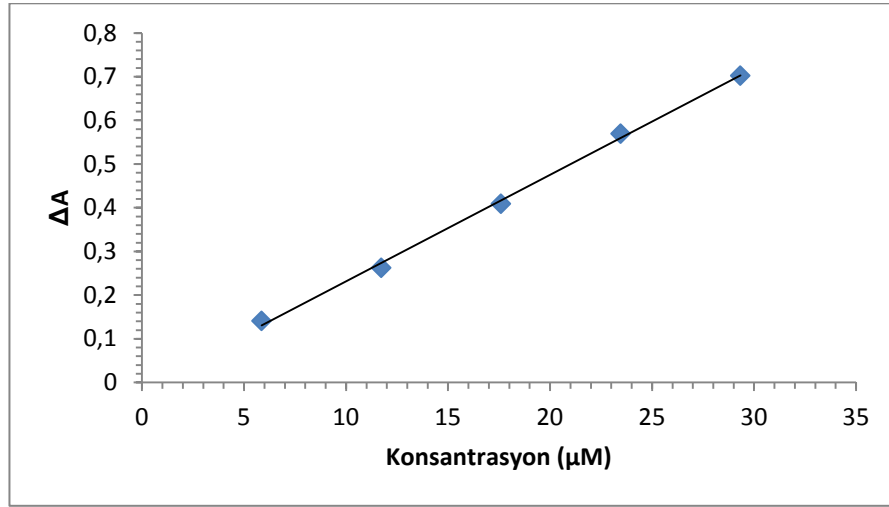
DNA, kendi başına CUPRAC reaksiyonu vermezken DNA'nın oksidatif hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir parçalanma ürünü olan 8-OHdG CUPRAC reaktiftir. 8-OHdG için CUPRAC kalibrasyonu Bölüm 3.4.1 de anlatılan şekilde uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: 8-OHdG konsantrasyonu ile CUPRAC absorbansları arasındaki ilişki ($A = 1,85 \times 10^{-4}C - 0,0038$; $R^2 = 0,9942$)

4.2. ABTS SONUÇLARI

DNA, kendi başına ABTS reaksiyonu vermezken parçalanma ürünü olan 8-OHdG için Bölüm 3.4.2 de anlatıldığı gibi ABTS yöntemi uygulanmış, yönteme ait kalibrasyon grafiği şekildeki gibi bulunmuştur.



Şekil 4.2: ABTS Yönteminde 8-OHdG konsantrasyonu ile ΔA arasındaki ilişki ($\Delta A = 2,44 \times 10^4 C - 0,0121$; $R^2 = 0,9981$)

4.3. MODİFİYE CUPRAC YÖNTEMİ OPTİMİZASYONU

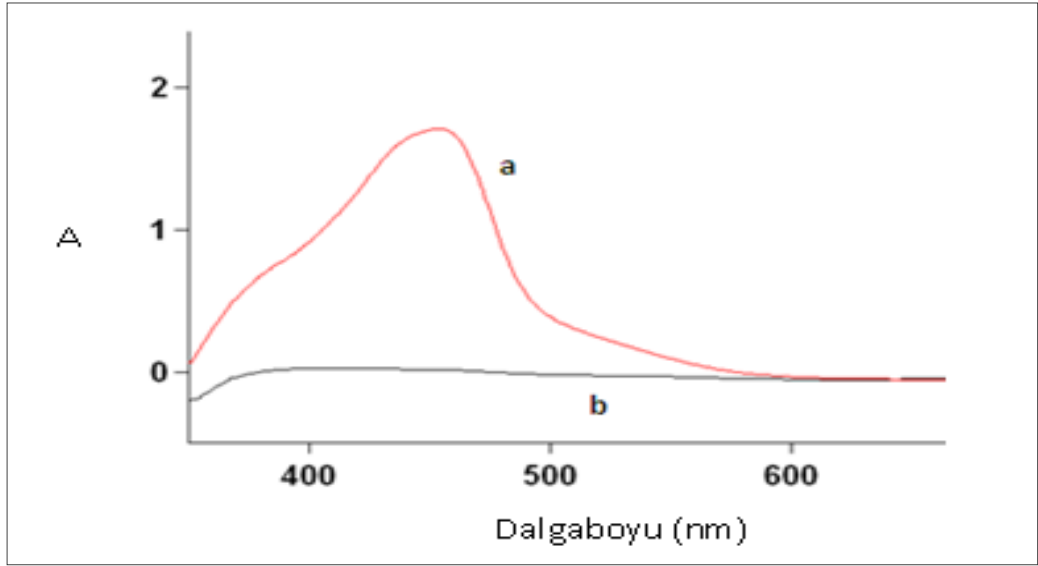
4.3.1. Optimum H_2O_2 Miktarı

Bölüm 3.4.3.1.'de anlatıldığı gibi yapılan peroksit denemesinde H_2O_2 miktarlarına karşılık elde edilen CUPRAC absorbansları aşağıda verildiği gibidir. Denemelerin sonucunda en uygun H_2O_2 miktarı 10 mM 1 mL olarak belirlendi.

Tablo 4.1: Farklı miktarlarda H_2O_2 varlığında DNA'ya ait modifiye CUPRAC absorbansları

H_2O_2 miktarı (mL)	Absorbans
0,50	0,2026
0,75	0,2673
1,00	1,2604

Geliştirilen yöntemde kullanılan H_2O_2 miktarının literatürde verilen miktardan daha yüksek olması ve katalaz kullanılmaması göz önüne alınarak Fenton reaksiyonu sonucunda ortamda H_2O_2 kalıp kalmadığının incelenmesi için 3.4.3.1 de anlatılan şekilde gerçekleştirilen denemelere ait absorbans spektrumları Şekil 4.3 de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: (a) Modifiye CUPRAC yöntemindeki konsantrasyona eşit olacak şekilde seyreltilmiş H_2O_2 için CUPRAC spektrumu; (b) Modifiye CUPRAC yönteminde referans olarak kullanılan DNA'sız çözelti için kaydedilen spektrum
Şekilden de görüldüğü üzere yöntemde kullanılan konsantrasyondaki H_2O_2 in CUPRAC absorbansı 1,711 iken Fenton yönteminin uygulanmasının ardından reaksiyon ortamından alınan çözelti için bu CUPRAC absorbansı yalnızca 0,015 olarak okunmuştur. Bu durum reaksiyonda H_2O_2 in tamamen tükendiğini göstermiştir. Dolayısıyla H_2O_2 in herhangi bir CUPRAC girişimi olması söz konusu değildir.

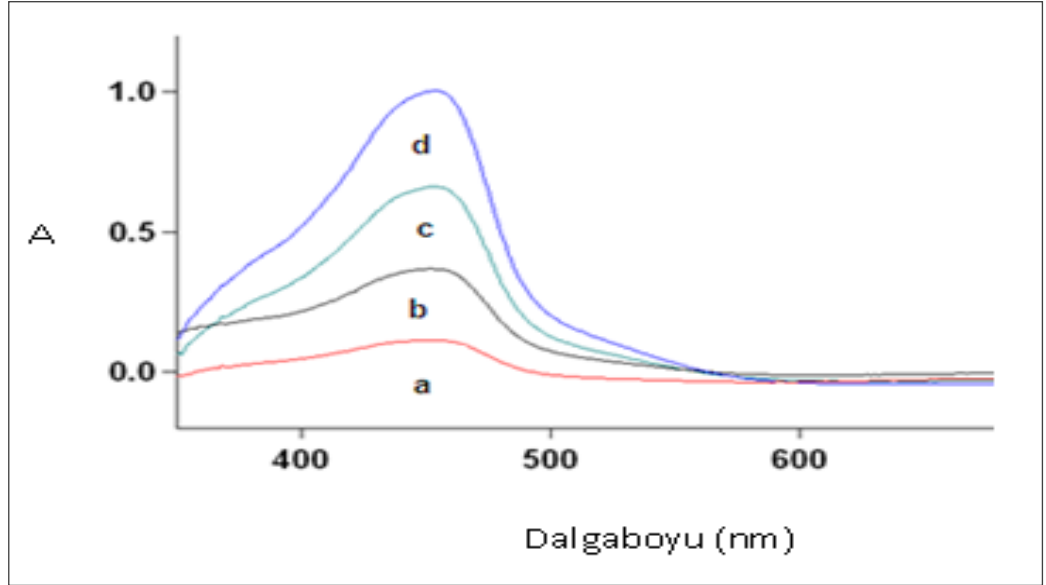
4.3.2.Katalaz Etkisi

Bölüm 3.4.3.2.'de anlatılan şekilde uygulanan yöntemde elde edilen katalaz konsantrasyonuna karşılık gelen CUPRAC absorpsiyon spektrumları Şekil 4.4 de gösterilmiştir. Buradan da görüleceği üzere katalaz miktarının azalmasıyla abasorbanslarda artış belirlendi.

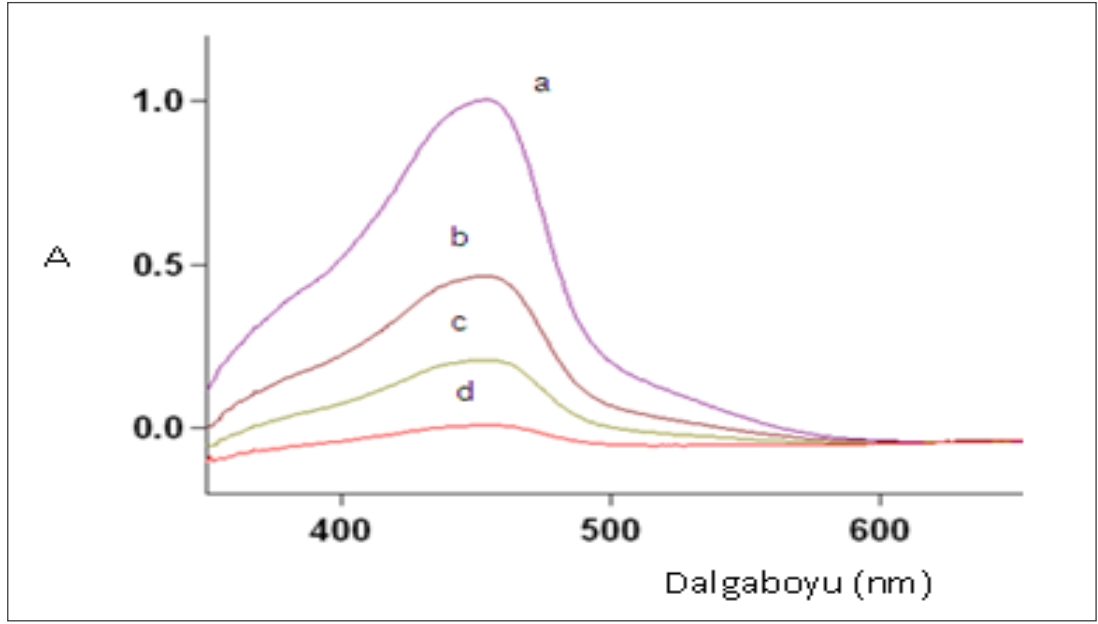
Bölüm 3.4.3.2.'de anlatılan şekliyle uygulanan yöntemde 25 U mL^{-1} katalaz ilavesiyle farklı zamanlarda alınan çözeltiler için elde edilen absorpsiyon spektrumları Şekil 4.5 de gösterilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak katalazın DNA'nın hidroksil radikalleri tarafından oksidatif hasarına yol açan reaksiyonu durduramadığı görülmüştür. Bu nedenle daha sonraki denemeler katalaz olmaksızın yapılmıştır.

4.3.3. Reaksiyonun Durdurulması

DNA'nın oksidatif hasarına ait reaksiyonu durdurmak için katalaz yerine (1 M 0,5 mL) HCl + (2,5 M 1 mL) NaCl karışımı sisteme ilave edilmesinin ardından farklı zamanlarda alınan santrifüj edilmiş ve edilmemiş örnekler CUPRAC Yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Katalaz konsantrasyonu sırasıyla (a) 300 U mL^{-1} , (b) 150 U mL^{-1} , (c) 75 U mL^{-1} ve (d) 25 U mL^{-1} olacak şekilde hazırlanan katalaz çözeltilerinin 0,5'er mL ilavesiyle elde edilen CUPRAC spektrumları



Şekil 4.5: 25 U mL⁻¹ 0,5 ml katalaz ilavesinden sonra DNA içeren Fenton inkübasyon çözeltisinden farklı zamanlarda alınan örnekler için kaydedilen CUPRAC spektrumları: (a) 0. dakikada; (b) 5. dakikada; (c) 10. dakikada; (d) 20. dakikada

Tablo 4.2: DNA'nın Fenton oksidasyonu sonrası HCl-NaCl varlığında reaksiyonun durdurulması sırasında santrifüj ve sürenin etkisi

Süre	Santrifüj edilmeden	Santrifüj edilerek
Başlangıç	1,0417	0,8736
5.dakikada	1,0517	0,8764
15.dakikada	1,0483	0,8490
30.dakikada	1,0230	0,8497

Reaksiyonu durdurmak için Bölüm 3.4.3.3 de anlatıldığı gibi, HCl-NaCl katmaksızın bu aşamada 0,6 M 0,5 mL TCA denendi. TCA katılmış örnek absorbansı ile de reaksiyonun durdurulduğu, stabilitenin korunduğu görüldü, sonuçlar Tablo 4.3 de gösterildi.

Tablo 4.3: DNA'nın Fenton oksidasyonu sonunda TCA varlığında reaksiyonun durdurulması sırasında süreye bağlı olarak Modifiye CUPRAC absorbands değişimi

Süre	Absorbans
Başlangıç	0,8100
10.dakikada	0,8358
20.dakikada	0,8462
45.dakikada	0,7815

4.3.4.Çözücü Etkisi

Farklı çözücülerin DNA içermeyen durumda tek başlarına mevcut sistemde durumları Bölüm 3.4.3.4 de anlatıldığı gibi incelendi. Etanol, THF ve DMSO'nun yüksek absorbands verdiği, aseton, asetonitril ve metanolün düşük absorbands verdiği görüldü.

Tablo 4.4: 1:5000 seyrelmiş 0,5'er mL çözücülerin DNA'sız Fenton oksidasyonu sonrası okunan CUPRAC absorbandsları

Çözücü	Absorbans
Etanol	0,6878
THF	1,4164
DMSO	1,6605
ASETONİTRİL	0,0026
ASETON	-0,0141
METANOL	-0,0221

Farklı oranlarda seyreltilmiş çözücüler Bölüm 3.4.3.4 de anlatıldığı gibi incelendiğinde, metanolün süpürücü gibi davrandığı, aseton ve etanolün ise seyrelmemiş durumda yüksek absorbandslar verdiği görüldü. Aynı gün yapılan denemelerde herhangi bir çözücü içermeyen DNA için okunan absorbands; 0,7403 olarak bulunmuş, çözücüler varlığındaki değerler Tablo 4.5-4.7 da verilmiştir.

Tablo 4.5: Farklı oranlarda seyreltilmiş metanolün Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbandsları

	DNA'SIZ	DNA'LI
Seyrelmemiş MeOH	-0,0014	0,0740
1:100 sey.	-0,0497	-0,0495
1:1000 sey.	-0,0500	0,0496
1:5000 sey.	-0,0502	0,3594

Tablo 4.6: Farklı oranlarda seyreltilmiş asetonun Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbanları

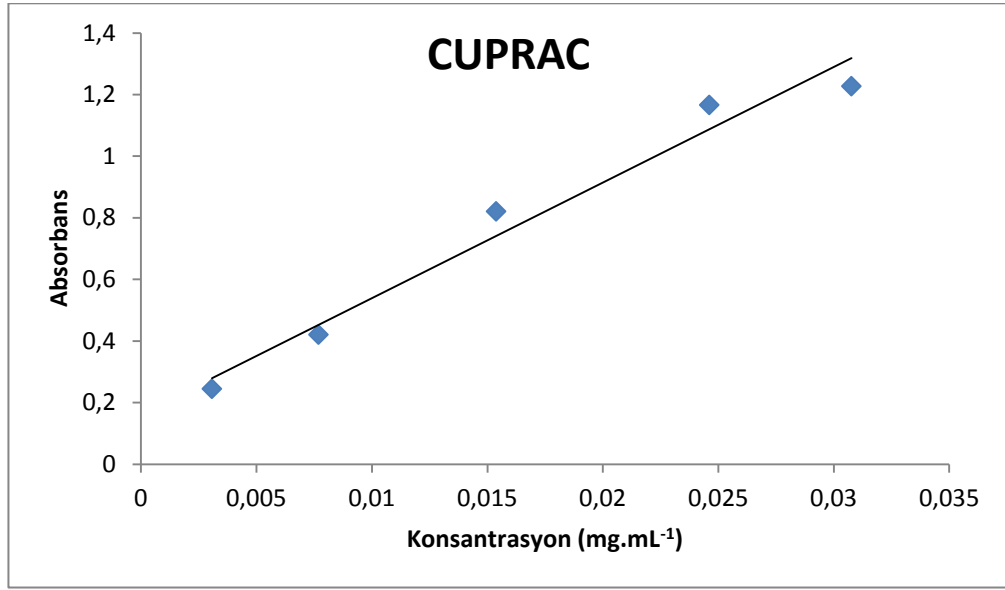
	DNA'SIZ	DNA'LI
Seyrelmemiş Aseton	2,0322	2,4374
1:100 sey.	1,6685	1,7913
1:1000 sey.	0,6388	1,0332
1:5000 sey.	-0,0165	0,8538

Tablo 4.7: Farklı oranlarda seyreltilmiş etanolün Fenton oksidasyonu sonunda DNA'lı ve DNA'sız CUPRAC absorbanları

	DNA'SIZ	DNA'LI
Seyrelmemiş EtOH	1,7311	1,7563
1:100 sey.	1,1866	0,9577
1:1000 sey.	1,1158	1,3918
1:5000 sey.	0,6969	1,0022

4.3.5.DNA Miktarı ile CUPRAC Absorbanları Arasındaki İlişki

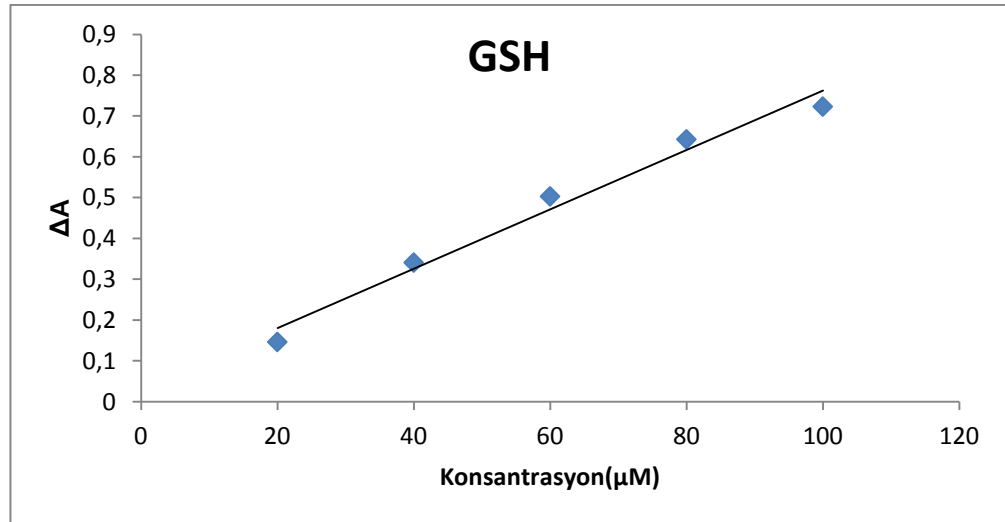
Konsantrasyonu 2 mg mL^{-1} olan stok DNA çözeltisinden alınan farklı hacimler için yöntem Bölüm 3.4.3.5 de anlatıldığı gibi uygulandı ve aşağıda verilen kalibrasyon doğrusu elde edildi. Ayrıca reaksiyonu durdurmak için HCl-NaCl karışımının yanısıra TCA kullanılmasıyla elde edilen her iki kalibrasyon doğrusunun birbirine yakın olduğu görüldü (TCA varlığında elde edilen doğru denklemi: $A = 3,6 \times 10^4 + 0,0802$; $R^2 = 0,9986$).



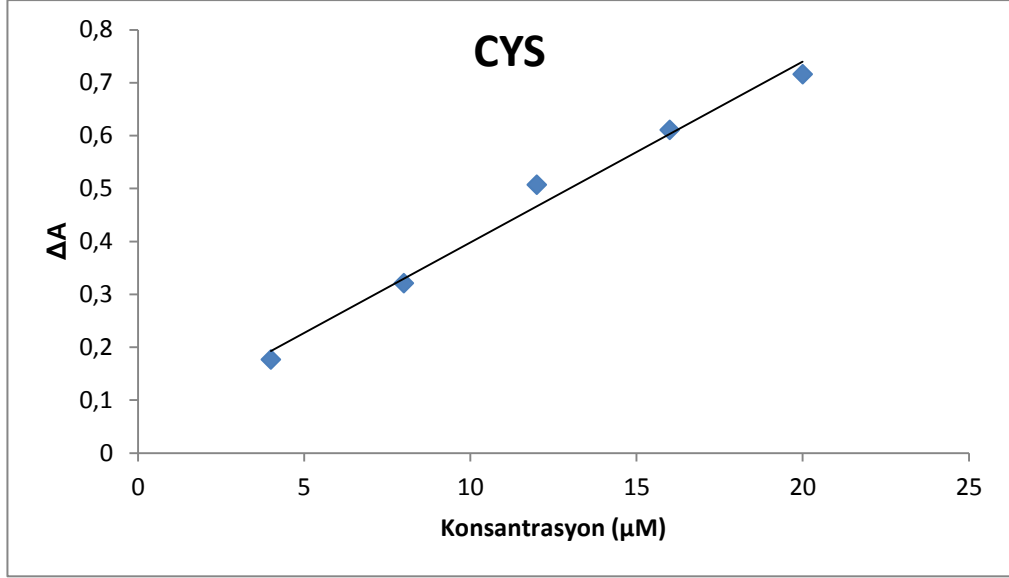
Şekil 4.6: CUPRAC metoduna göre HCl-NaCl varlığında DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği ($A = 3,7 \times 10^4 C + 0,164$; $R^2 = 0,9699$)

4.3.6.Çeşitli Antioksidanların Varlığında Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi

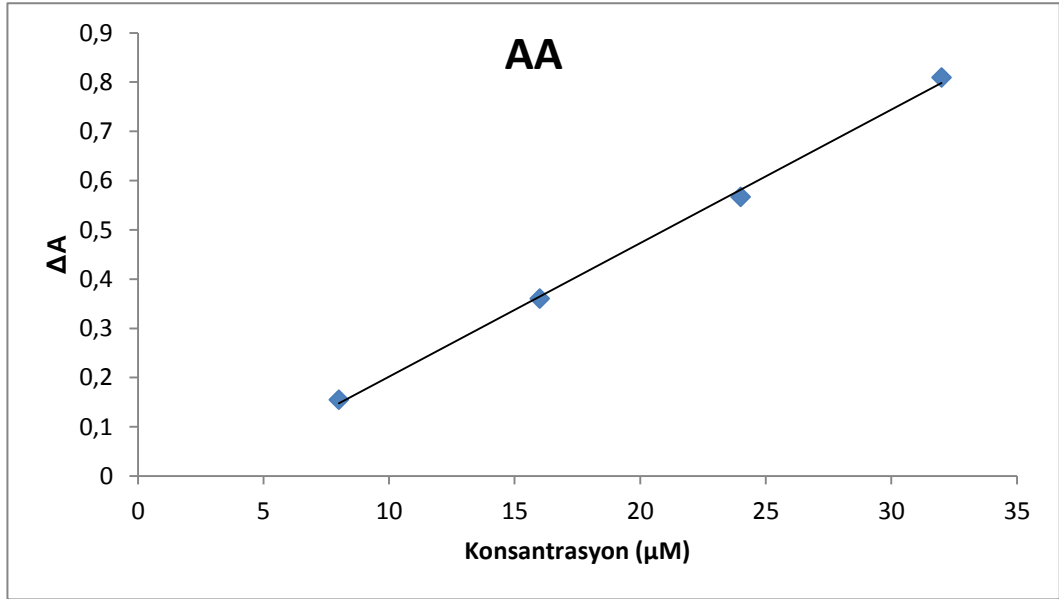
Çeşitli antioksidanlar sisteme dahil edilmiş ve antioksidansız ve antioksidanlı örnekler için bulunan absorbans farkları (ΔA) nın antioksidan konsantrasyonuna karşı çizilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafikleri ve bunlara ait doğru denklemleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7 – 4.10). Antioksidan varlığında DNA hasarı dolayısıyla CUPRAC absorbansı azalmaktadır.



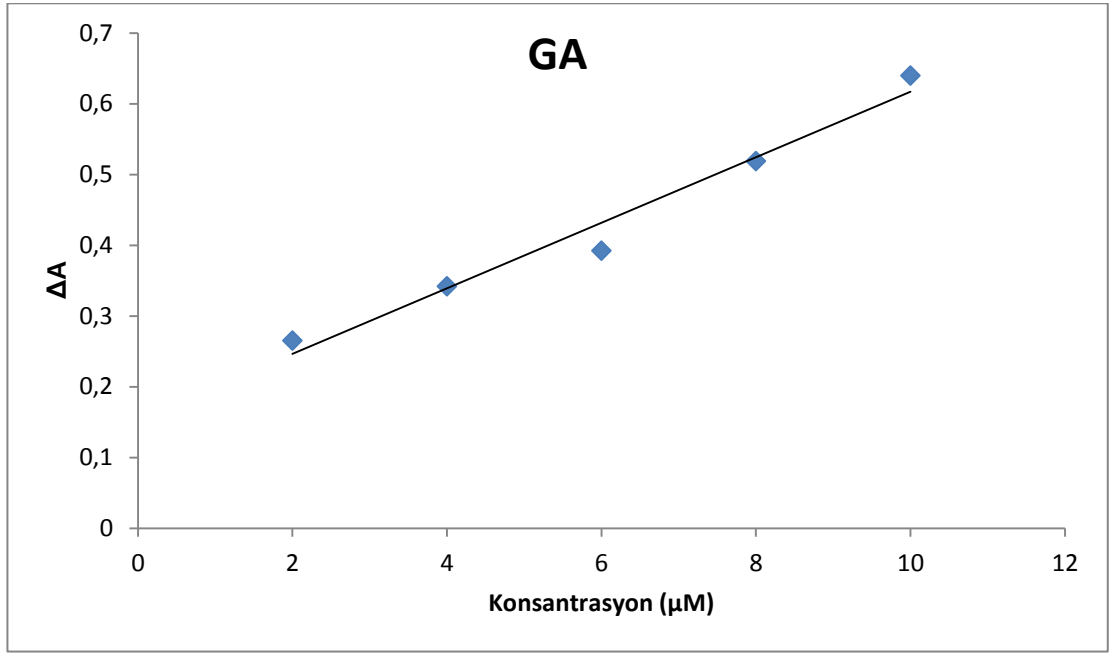
Şekil 4.7: CUPRAC Yönteminde GSH konsantrasyonu ile absorbans azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 7,28 \times 10^3 C + 0,0346$; $R^2 = 0,9787$)



Şekil 4.8: CUPRAC Yönteminde CYS konsantrasyonu ile absorbans azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 3,42 \times 10^3 C + 0,0557$; $R^2 = 0,9862$)



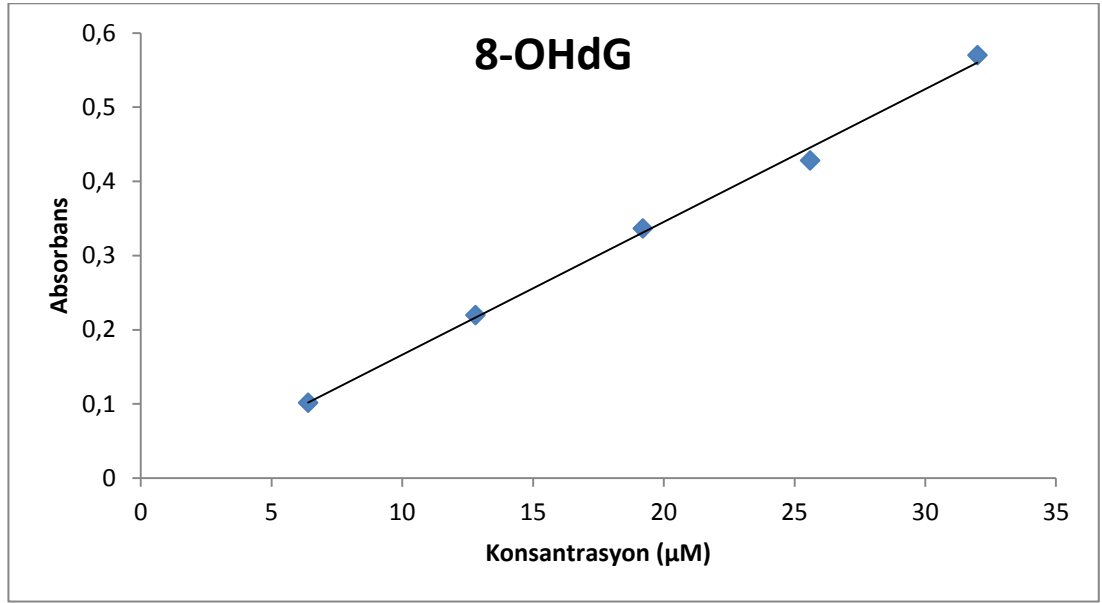
Şekil 4.9: CUPRAC Yönteminde AA konsantrasyonu ile absorbans azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 2,71 \times 10^4 C - 0,0694$; $R^2 = 0,9983$)



Şekil 4.10: CUPRAC Yönteminde GA konsantrasyonu ile absorbans azalması arasındaki ilişki ($\Delta A = 4,63 \times 10^4 C + 0,1537$; $R^2 = 0,9721$)

4.3.7.8-hidroksi-2'-deoksiguanozine Modifiye CUPRAC Şartlarının Uygulanması

8-OHdG, modifiye CUPRAC yönteminde olduğu gibi 10 dakika 37°C inkübe edilmiş, ardından bu 8-OHdG için modifiye CUPRAC metodu Bölüm 3.4.3.7 de anlatılan şekilde uygulanmıştır. Yönteme ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.11 de verilmiştir. Yöntem için CUPRAC absorbansları 5. dakikada ve 30. dakikada okunmuş, absorbanslar arası önemli bir fark görülmemiştir.

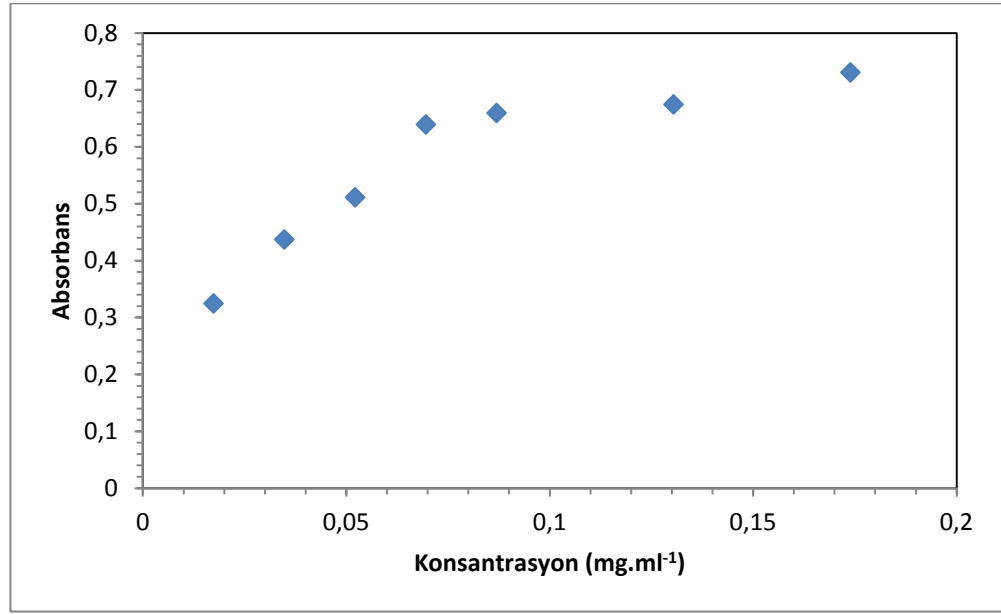


Şekil 4.11: Modifiye CUPRAC yöntemine göre 8-OHdG konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri ($A = 1,79 \times 10^{-4} C - 0,0124$; $R^2 = 0,9966$)

4.4. TBARS [11] METODU VE İKİ YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI

4.4.1 DNA Miktarı ile Yöntem Lineerliği

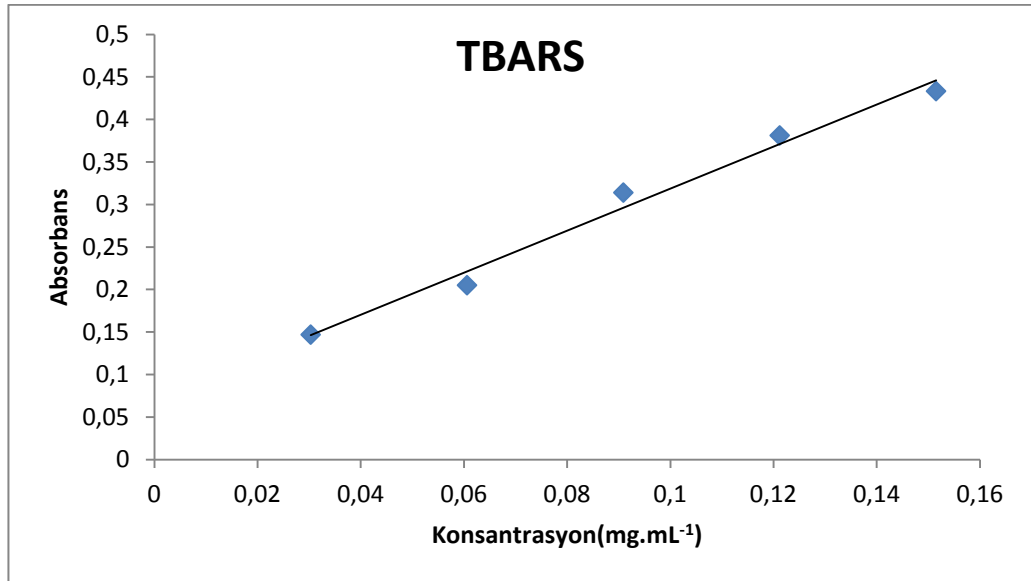
DNA hasarı dolaylı yoldan TBARS yöntemiyle de ölçülebilir. Bu amaçla konsantrasyonu 2 mg mL^{-1} olan stok DNA çözeltisinden alınan farklı hacimler için standart yöntem olarak seçilen TBARS Yöntemi Bölüm 3.4.4 de anlatıldığı gibi uygulandı ve aşağıda verilen kalibrasyon doğrusu elde edildi.



Şekil 4.12: TBARS metoduna göre DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği

4.4.2.Reaksiyonun Durdurulması

TBARS Yöntemi için yapılan çalışmada kullanılan 0,5 mL 0,6 M TCA geliştirilen CUPRAC yöntemi ile uyumlu olacak şekilde 1 M HCl ve 2,5 M NaCl ile değiştirilerek denemeler tekrarlandı. Bu durumda daha geniş bir lineer aralık elde edildi ve bulanıklıkta TCA'lı sisteme göre azaldı görüldü.



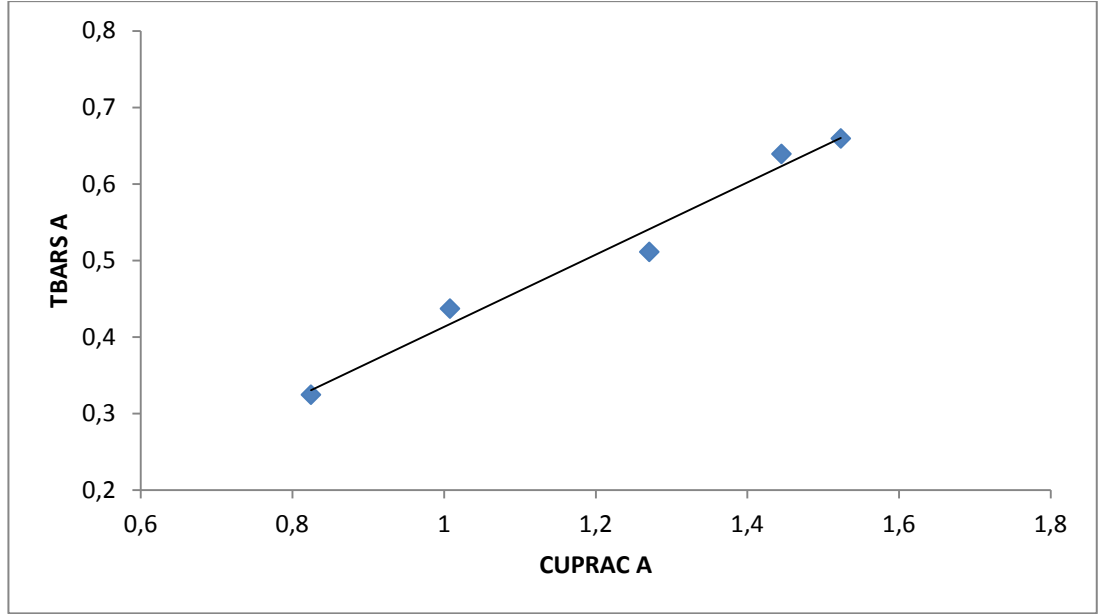
Şekil 4.13: HCl-NaCl varlığında TBARS metoduna ait DNA konsantrasyonu-absorbans grafiği ($A = 2,4707C + 0,0715$; $R^2 = 0,9852$)

4.4.3. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Yöntemler arası korelasyonun incelenmesi amacıyla TBARS için uygun son konsantrasyonlara modifiye CUPRAC yöntemi uygulandı. Aynı konsantrasyonlar için TBARS ve CUPRAC absorbansları belirlendi (Tablo 4.8) Yöntemler arası korelasyon grafiği şekilde verildi.

Tablo 4.8: İki farklı yöntem için aynı konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri

C _{SON} DNA (mg mL ⁻¹)	CUPRAC	TBARS
1,74×10 ⁻²	0,8244	0,3245
3,48×10 ⁻²	1,0078	0,4370
5,22×10 ⁻²	1,2707	0,5111
6,96×10 ⁻²	1,4450	0,6391
8,70×10 ⁻²	1,5233	0,6593



Şekil 4.14: Konsantrasyonları aynı olacak şekilde hazırlanan DNA çözeltileri ile yapılan CUPRAC ve TBARS yöntemleri arası korelasyon grafiği
($y = 0,4715x - 0,0583$ $R^2 = 0,9799$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Reaktif oksijen türleri (ROS) canlı hücrelerde metabolik olaylar süresince doğal olarak oluşur, ve kararlı olmayan yapılarından ötürü oldukça reaktiftirler. Bu nedenle hücre membranı, lipid ve nükleik asitlere zarar vererek oksidatif hasara uğrattırır [5]. Nükleik asitlere, DNA'ya, en fazla hasar veren reaktif oksijen türü hidroksil radikalidir. Bu radikal farklı şekillerde üretilmesine rağmen en yaygın kullanılan yöntem Fenton reaksiyonudur [17].

Oksidatif DNA hasarında meydana gelen ilk olay baz modifikasyonlarıdır. Bunun ardından tek ve çift dal kırıkları ve abazik alanlar oluşumu görülür. DNA yapısındaki guanin iyonizasyon potansiyeli en düşük olan baz olmasından dolayı modifikasyona en yatkın bazdır. Bu nedenle öncelikli olarak hasara uğrar ve dolayısıyla oksidatif stres biyobelirteci olarak ölçülür [12]. Bu nedenle üzerinde en fazla çalışılan DNA bazıdır.

Bu çalışmada, daha önce geliştirilen ve salisilat probu kullanılarak hidroksil radikallerinin tayin edilmesi ve polifenollerin hidroksil radikali süpürme etkinliklerinin incelenmesine uygulanan modifiye CUPRAC yöntemi [10] DNA için uyarlanmıştır. Yapılan denemelerde DNA kendi başına CUPRAC reaksiyonuna cevap vermezken bunun bir hasar ürünü olan 8-OHdG nin CUPRAC ve ABTS reaksiyonlarına lineer bir şekilde cevap verdiği görülmüştür.

Ayrıca 8-OHdG için orijinal CUPRAC yöntemi yanında, yöntem DNA nın oksidatif hasar ürünlerinin belirlenmesi için geliştirilmiş olan şekliyle de uygulanmıştır. Burada amaç modifiye CUPRAC yönteminin uygulanması sırasında yapılan işlemlerin 8-OHdG üzerinde neden olabileceği değişimlerin incelenmesidir. Bunun sonucunda 8-OHdG için hem orijinal CUPRAC hem de geliştirilen yöntemin sonuçları arasında önemli bir farka rastlanmamıştır.

DNA için geliştirilen yöntemde daha önce uygulanan modifiye CUPRAC yöntemine göre [10] peroksit miktarı arttırılmıştır. Salisilat probu varlığında kullanılan modifiye CUPRAC yöntemi üzerinde yapılan değişiklikler (0,5 mL yerine 1,0 mL 10 mM H₂O₂ kullanılması, katalaz kullanılmaması) sayesinde DNA için salisilat probu kullanılan yöntemin orjinaline göre daha yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir. Bunun nedeni DNA üzerinde oksidatif hasarın arttırılması olarak yorumlanmıştır. CUPRAC reaktif olan H₂O₂ miktarının arttırılması ile Fenton reaksiyonunun sonunda ortamda CUPRAC reaktifi ile reaksiyon verebilecek konsantrasyonda peroksit kalıp kalmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle son konsantrasyonu işlemde kullanılan hidrojen peroksit ile aynı olacak şekilde bir çözelti hazırlanmış ve CUPRAC yöntemi uygulanarak absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Ardından çalışmada kullanılan modifiye CUPRAC metodu DNA olmaksızın tüm diğer ilaveler yapılarak aynen uygulanmış ve buradan alınan örneğe ait spektrum da çizilmiştir. Spektrumlar karşılaştırıldığında hidrojen peroksit çözeltisinin 450 nm de verdiği absorbans 1,711 iken DNA sız çözelti için okunan absorbans değerinin sıfıra yakın olduğu bulunmuştur. Bu sonuç Fenton reaksiyonunun sonunda peroksidin tamamına yakınının tükendiğini düşündürmüştür.

Çalışmada literatürde verilen yönteme [10] göre artan peroksit miktarının çözücüler üzerinde daha önce belirtilene göre çok daha fazla etki yarattığı belirlenmiştir. Bu nedenle antioksidanların çözeltiliye alınmasında ve ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan çözücülerin DNA varlığında ve yokluğunda yönteme verdikleri cevap incelenmiştir. Denenen seyreltik çözeltilerden etanol, THF ve DMSO reaksiyon ortamında DNA olmaksızın yöntem uygulandığında yüksek CUPRAC absorbansları verirken aseton, asetonitril ve metanol tek başlarına reaksiyon vermemiş ancak DNA varlığında DNA nın CUPRAC absorbansında değişimlere neden olmuştur. Özellikle metanolün radikal süpürücü gibi davrandığı belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmada sadece suda çözünen antioksidanların hidroksil radikallerini süpürme etkinlikleri incelenebilmiştir. Suda çözünen antioksidanların varlığında oksidatif hasarın göstergesi olan CUPRAC absorbansında düşüş görülmüştür.

Yöntemin literatürde verilen şeklinde [10] yer alan katalazın etkisi incelenmiş ve katalaz varlığında CUPRAC absorbanslarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda katalaz varlığında, katalazın azalması ile absorbansın arttığı

görülmüştür. Belirli miktarda katalaz seçilmiş, ancak katalaz varlığında reaksiyonun durmadığı, farklı zamanlarda alınan inkübasyon çözeltilisinin zamana bağlı olarak CUPRAC absorbansında düşüş olduğu ve sifıra yaklaştığı görülmüştür. Bu nedenle reaksiyonu durdurmak için HCl+NaCl karışımı sisteme dahil edilmiştir. Ortamda H^+ artışı ile protein yapılı DNA çökmekte ve reaksiyonun bu şekilde durdurulduğu düşünülmektedir.

Düşen pH değerini ayarlamak için CUPRAC karışımına farklı konsantrasyonlarda Na_2CO_3 ilave edilmiştir ve en iyi sonucun %0,5'lik (w/v) olduğu görülmüştür. Çalışmada en uygun koşulların belirlenmesinin ardından farklı miktarlarda DNA içeren çözeltilere yöntem uygulanmış ve DNA miktarının artışına bağlı olarak hasar göstergesi olan absorbanslarda da artış görülmüştür. Bunun yanı sıra TCA'nın da HCl-NaCl sisteminde olduğu gibi reaksiyonu durdurduğu ve HCl-NaCl olan sisteme benzer şekilde sonuç verdiği belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemi doğrulama metodu olarak TBARS metodu kullanılmıştır [11]. Bu yöntemde, DNA miktarının artmasına bağlı olarak öncelikle absorbansın arttığı ancak daha sonra sabit kaldığı görülmüştür. DNA miktarına bağlı olarak lineerliğin CUPRAC yöntemine göre daha dar bir alanda olduğu bulunmuştur. Ayrıca CUPRAC yönteminin TBARS yöntemine göre çok daha seyreltik çözeltilere uygulanabildiği bir başka deyişle hassasiyetinin daha fazla olduğu saptanmıştır. TBARS yönteminde TCA yerine geliştirilen yöntemdekine benzer şekilde HCl-NaCl karışımının eklenmesi ile gerçekleştirilen yöntemde daha geniş aralıkta lineerlik ve bulanıklıkta azalma görülmüştür.

Ayrıca her iki yöntem için DNA miktarına bağlı olarak gerçekleşen hasarın göstergesi olan absorbanslar arasındaki uyum incelenmiş ve absorbanslar arasındaki korelasyonu gösteren R^2 değerinin 0,9799 olduğu saptanmıştır. Benzer temele dayanan ve her ikisi de Fenton yöntemiyle elde edilen hidroksil radikallerinin oluşturduğu toplamsal DNA hasarını spektrofotometrik olarak ölçen modifiye CUPRAC ve TBARS sonuçları arasındaki uyum dikkate değer ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu da geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçların daha önce yayınlanmış olan ve DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan standart yöntem ile kıyaslanmasını sağlamıştır.

8-OHdG, DNA'nın oksidatif hasarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir oksidatif hasar ürünüdür. Ancak DNA hasarı sonucunda çok sayıda farklı ürünlerin oluştuğu literatürde bildirilmiştir. CUPRAC yönteminde elde edilen absorbans yalnızca 8-OHdG'den kaynaklı olmayıp DNA'dan CUPRAC yöntemine cevap veren farklı bozunma ürünlerinin oluştuğunu düşündürmüştür. Ancak 8-OHdG literatürde en yaygın DNA oksidatif hasar belirteci olarak kullanıldığından DNA'nın hidroksil radikalleri ile oksidatif parçalanmasıyla oluşan 8-OHdG için ürün karakterizasyonu ve yöntem kıyaslaması çalışmaları devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Wiseman, H., Halliwell, B., 1996, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochemical Journal*, 313, 17-29.
- [2]. Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito, H., Nishimura, S., 1996, Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives, *Nucleic Acids Research.*, 12 (1984) 2127-2136.
- [3]. Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., Wu, J.T., 2004, Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes, *Clinica Chimica Acta*, 339, 1-9.
- [4]. Hiroshi, K., 1997, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutation Research*, 387, 147-163.
- [5]. Dizdaroğlu, M., Jagura, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurements, *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 1102-1115.
- [6]. Jaruga, P., Dizdaroğlu, M., 2010, Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397, 48-52.
- [7]. Jaruga, P., Rodriguez, H., Dizdaroğlu, M., 2001, Measurement Of 8-Hydroxy-2'-Deoxyadenosine In DNA By Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 336-344,
- [8]. Watson, J.T., 1990, Selected-ion measurements, *Methods in Enzymology*, 193, 86-106.
- [9]. Bektaşoğlu, B., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2008, Hydroxyl radical detection with salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77, 90-97.
- [10]. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, R., 2008, Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation, *Analytica Chimica Acta*, 616, 196-206.
- [11]. Li, X., Mai, W., Wang, L., Han, W., 2013, A hydroxyl-scavenging assay based on DNA damage in vitro, *Analytical Biochemistry*, 438, 29-31.

- [12]. Hasbal, C., 2008, *Bronşiyal Astımlı Çocuklarda Oksidatif DNA Hasarı*, Uzmanlık Tezi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği
- [13]. Kohen, R., Nyska, A., 2002, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicologic Pathology*, 30 (6), 620–650.
- [14]. Büyükben, A., 2014, *Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Protein ve DNA Hasarı Üzerine Quercetin Etkisi*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [15]. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- [16]. Halliwell, B., 1999, Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition, *Mutation Research*, 443, 37–52.
- [17]. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, A., 2009, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis, *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology*, 27, 120–139.
- [18]. Burçak, G., Andican, G., 2004, Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (4), 159-169.
- [19]. Eken, A., 2012, Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 69-73.
- [20]. Yıldız L., Başkan K., Tütem E., Apak R., 2008, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta*, 77, 304–313.
- [21]. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- [22]. K Macdonald-Wicks, L., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056.
- [23]. Çetinkaya, A., 2013, *Antioksidan kapasite ile reaktif oksijen türleri tüketimi arasındaki ilişki*, Yüksek lisans tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [24]. Büyüktuncel, E., 2013, Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca Spektrofotometrik Yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17, 93-103.

- [25]. Tekşen, F., 2006, *Tıbbî Biyoloji ve Genetik Ders Kitabı*, Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Yayınları, Ankara.
- [26]. Arıcan E., 2011, *Moleküler Biyoloji*, muhendis.kafkas.edu.tr/doc/personel-dosyaları/download.php?file=2, [Ziyaret tarihi: 25 Mayıs 2015]
- [27]. Andican, G., 2000, *Oksidatif DNA hasarı göstergesi olan 8-Hidroksideoksiguanozin'in analiz yöntemi ve STZ diabetik sıçanlarda uygulanması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [28]. Yang, M.H., Schaich, K.M., 1996, Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes, *Free Radical Biology and Medicine* , 20, 225-236.
- [29]. Simic, M.G., 1994, DNA Markers of oxidative processes in vivo: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis, *Carcinogenesis*, 54(suppl), 1918s-1923s.
- [30]. Halliwell, B., Auruoma, O., 1991, DNA damage by oxygen-derived species, *Federation of European Biochemical Societies*, 281, 9-19.
- [31]. Atmaca, E., Aksoy, A., 2009, Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 79-83.
- [32]. Cadet,J., Douki,T., Gasparutto, D., Ravanat, J., 2003, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutation Research*, 531, 5–23.
- [33]. Loft, S., Poulsen, H.E, 1998, Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products, *Acta Biochimica Polonica*, 45 (1), 133-144.
- [34]. Kasai, H., Nishimura, S., 1984, Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Research*, 12 (4), 2137-2145.
- [35]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- [36]. Re, R., Pellegrini, N., 1999, Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.

EKLER

EK-1 8-OHdG İÇİN KALİBRASYON DENKLEMLERİ

8-OHdG için uygulanan CUPRAC ve ABTS yöntemlerine ait lineer kalibrasyon denklemleri

Yöntem	Kalibrasyon Doğrusu	Korelasyon Katsayısı
CUPRAC	$A = 1,85 \times 10^{-4} C - 0,0038$	$R^2 = 0,9942$
Modifiye CUPRAC	$A = 1,79 \times 10^{-4} C - 0,0124$	$R^2 = 0,9966$
ABTS	$\Delta A = 2,44 \times 10^{-4} C - 0,0121$	$R^2 = 0,9981$

EK-2 ANTİOKSİDANLAR İÇİN KALİBRASYON DENKLEMLERİ

Uygulanan modifiye CUPRAC metoduna göre kullanılan antioksidanlara ait kalibrasyon denklemleri.

Antioksidan	Kalibrasyon Doğrusu	Korelasyon Katsayısı
CYS	$\Delta A = 3,42 \times 10^{-3} C + 0,0557$	$R^2 = 0,9862$
AA	$\Delta A = 2,71 \times 10^{-4} C - 0,0694$	$R^2 = 0,9983$
GSH	$\Delta A = 7,28 \times 10^{-3} C + 0,0346$	$R^2 = 0,9787$
GA	$\Delta A = 4,63 \times 10^{-4} C + 0,1537$	$R^2 = 0,9721$

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Seda UZUNBOY
Uyruğu	T.C
Doğum tarihi, Yeri	10.12.1990, KAĞITHANE
Telefon	0538 651 6147
E-mail	sedauzunboy@hotmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Anabilim Dalı/ Analitik Kimya Programı	2015
Lisans	İ.Ü./ Mühendislik Fakültesi/Kimya Bölümü	2012
Lise	Gültepe Y.D.A. Lisesi	2008