

**T.C.**

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİRAZ YAPRAĞI EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN  
KAPASİTESİNİN VE OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN  
BELİRLENMESİ**

**KASIM TAKIM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA**

**AĞUSTOS 2010**

Tezin Başlığı: KİRAZ YAPRAğI EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN VE OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan: **Kasım TAKİM**

Sınav Tarihi:

### **Sınav Jürisi Üyeleri**

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

.....

Doç. Dr. Burhan ATEŞ

.....

Yrd.Doç.Dr. Türkan KUTLU

.....

Yukarıda adı geçen tez, jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Asım KÜNKÜL  
Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ KİRAZ YAPRAĞI EKSTRAKTLARININ ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİNİN VE OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ ” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığı ve yaralandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Kasım TAKİM

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KİRAZ YAPRAĞI EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN VE OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Kasım TAKIM

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

66+13 sayfa

2010

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Türkan KUTLU

Bu çalışmada, Dalbastı Kirazı(*prunus avium L.*) kurutulmuş yaprağının farklı ekstraktlarının( etanol, metanol, etil asetat, sıcak su ve soğuk su) antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Bu ekstraktların oksidatif DNA hasarı üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu çalışmada antioksidan kapasite ABTS(2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ve DPPH(2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme aktivitesi , indirgeme gücü, OH<sup>•</sup> radikal süpürme aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürme kapasitesi, Metal şelatlama aktivitesi, Deoksi riboz yöntemi ve β-karoten beyazlatma yöntemi ile belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarları Folin- Ciocalteus metodu ile belirlenmiş ve BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), Trolox (6-Hidroksil-2,5,7,8-Tetrametil Kroman-2-Karboksilik asit) ve α-tokoferol standart antioksidanlarla karşılaştırılmıştır. Metanol ve etanol ekstraktları yapılan antioksidan kapasite yöntemlerinde yüksek radikal süpürme aktivitesi göstermiştir ve Hidroksil radikalının yapmış olduğu hasara karşı DNA'yı %90-98 oranında koruduğu gözlenmiştir. Toplam fenolik madde kiraz yaprağı etanol, metanol, etil asetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarında sırasıyla 116.43;132.17;61.91;87.63 ve 66.88 mili eşdeğergram(meg) gallik asit/g kuru yaprak olarak bulunmuştur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Antioksidan aktivite, DNA hasarı, Polifenol,Radikal

## ABSTRACT

M. Sc. Thesis

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND OXIDATIVE DNA DAMAGE OF CHERRY LEAVES(*PRUNUS AVIUM L*) EXTRACTS

Kasım TAKIM

Inonu University

Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

66 + 13 pages

2010

Supervisor: : Yrd.Doç.Dr. Türkan KUTLU

In present study, ethanol, methanol, ethyl acetate, hot and cold water and water extracts of dalbasti cherry (*Prunus Avium L.*) leaves were investigated. These extracts were studied for antioxidant capacity and examined for its DNA damage protecting activity. The antioxidant capacity of these extracts were evaluated using different antioxidant tests, including reducing power, free radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, hydrogen peroxide scavenging, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS radical scavenging, Deoxyribose assay,  $\beta$ -Carotene bleaching assay and metal chelating activities. The content of total phenolic compounds in the methanol, ethanol, ethyl acetate, hot and cold water extracts of cherry (*Prunus Avium L.*) leaves was determined using Folin-Ciocalteus reagent and compared with standart antioxidants BHT, Trolox and  $\alpha$ -tocopherol. Metanol and ethanol ekstrakts showed a concentration-dependent free radical scavenging capacity and protective effect on DNA cleavage. Ethanol and methanol extracts of cherry leaves. at 400 $\mu$ g/ml exhibited significant protecting activity against DNA strand scission by OH $\cdot$  on pBR322 supercoiled plasmid DNA(95-98%). Total phenolic compounds in the cherry leaves extracts (ethanol, methanol, ethyl acetate, hot- water and water) were determined as gallic acid equivalent (meq/g dried leaves) 116.43;132.17;61.91;87.63 and 66,88 respectively.

Keywords: DNA damage; Polyphenol; Antioxidant activity; Radikal

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmamda bana emeği geçen baőtta danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Tőrkan Kutlu olmak üzere tüm İnönü Üniverstesini Kimya Bölümü öğretim görevlilerine özellikle Prof.Dr. İsmet Yılmaz ve Doç.Dr. Burhan Ateş hocalarıma, deney aşamasında bana çok yardımı dokunan arkadaşım Kadir Yılmaz'a, ayrıca laboratuvarlarından ve tecrübelerinden çok fazla istifade ettiğim değerli hocam Doç.Dr. Murat Kızıl'a ve Bircan çeken'e ve hayatım boyunca emek ve destekleri ile beni ayakta tutan sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
GİRİŞ	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR</b>	<b>3</b>
2.1. Kiraz ve Kiraz Yaprağı	3
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	4
2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler	5
2.2.2. Süperoksit Radikali	6
2.2.3. Hidrojen Peroksit	6
2.2.4. Hidroksil Radikali	7
2.2.5. Singlet Oksijen	7
2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	7
2.3.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri	7
2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	8
2.3.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	8
2.3.4. Reaktif Oksijen Türlerin Bağışıklık Sistem Üzerindeki Etkileri	9
2.4. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Koruma Mekanizmaları	9
2.4.1. Antioksidatif Sistemler	10
2.4.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	10
2.4.2.1. Doğal Antioksidanlar	10
2.4.2.2. Fenolik Bileşikler	12
2.4.2.3. Fenolik Bileşiklerin Kimyası	13
2.4.2.4. Fenolik Bileşiklerin Hastalıklar Üzerine Olumlu Etkisi	13
2.4.2.5. Fenolik Bileşiklerin Riskleri	14
2.4.2.6. Diyetle Fenolik Bileşiklerin Alımı	14
2.4.2.7. Fenolik Bileşiklerin Emilimi ve Biyoyararlığı	14

2.4.2.8.	Antioksidanların Etki Mekanizması	15
2.5.1.	DNA Yapı ve Fonksiyonu	16
2.5.1.1.	Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Önemi	17
2.5.1.2.	DNA`da Oksidatif Hasar Mekanizmaları	18
2.5.1.3.	DNA`da Oksidatif Hasar ile Oluşan Bazı Lezyonlar	19
2.5.1.4.	8OHdG Oluşumu	20
2.5.1.5	DNA Tamir Mekanizmaları	21
2.6.	Beslenmenin DNA Üzerine Etkisi	22
2.7.	Kaynak Özeti	23
<b>3.</b>	<b>ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	<b>25</b>
3.1	Materyal	25
3.1.1.	Araç Gereçler	25
3.1.2.	Kimyasallar	25
3.2.	Yaprakların Toplanması, Kurutulması ve Ekstraksiyonu	26
3.3.	Antioksidan Aktivite	27
3.3.1.	İndirgeme Gücü Tayini	27
3.3.2.	DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini	27
3.3.3.	ABTS Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini	28
3.3.4.	OH <sup>-</sup> radikal Süpürme Aktivitesi Tayini	29
3.3.5.	Toplam Fenolik Bileşik Tayini	29
3.3.6.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Süpürme Kapasitesi Tayini	30
3.3.7.	Deoksiriboz Yöntemi	30
3.3.8.	β-Karoten Beyazlatma Yöntemi	31
3.3.9.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.3.9.1.	DNA `da Oksidatif Hasar Oluşturma ve Bitki Ekstraktlarının Koruyucu Özelliğinin Gözlenmesi	35
3.3.9.2.	Agaroz Jel'in Hazırlanması	36
3.3.9.3.	Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	37
3.3.9.4.	Jel Görüntüleme Cihazında DNA hasarının ölçümü	38
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA ve BULGULAR</b>	<b>41</b>
4.1.	İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları	39
4.2.	DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Sonuçları	41
4.3.	ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları	42
4.4.	OH <sup>-</sup> Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Sonuçları	43

4.5.	Toplam Fenolik Bileşik Tayini Sonuçları	44
4.6.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Süpürme Kapasitesi Tayini Sonuçları	45
4.7.	Deoksiriboz Yöntemi Sonuçları	46
4.8.	$\beta$ -Karoten Beyazlatma Yöntemi Sonuçları	47
4.9.	DNA 'da Oksidatif Hasar Oluşturma ve Bitki Ekstraktlarının Koruyucu Özelliğinin Gözlenmesi Sonuçları	48
5.	<b>SONUÇ ve TARTIŞMA</b>	53
6.	<b>KAYNAKLAR</b>	57
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Kiraz yaprağı ve meyvesinden bir görünüm	4
Şekil 2.2.	Oksidatif hasarı artıran çevresel faktörler	6
Şekil 2.3.	DNA' nın yapısı	20
Şekil 2.4.	8OHdG Oluşum Mekanizması	24
Şekil 3.1.	DNA' nın farklı formları	36
Şekil 3.2.	Biorad Jel Görüntüleme Cihazı' ndan bir görünüm	42
Şekil 4.1.	Trolox, BHT, $\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 50, 150, 250 $\mu$ g/ml'de indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği	43
Şekil 4.2.	Trolox, BHT, $\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200 ve 300 $\mu$ g/ml'de DPPH radikal süpürme gücü karşılaştırmalı grafiği	43
Şekil 4.3.	Trolox, BHT, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200 ve 300 $\mu$ g/ml'de ABTS radikal süpürme gücü karşılaştırmalı grafiği	44
Şekil 4.4.	$\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200, 300 $\mu$ g/ml'de OH radikal süpürme aktivitesi antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği	44
Şekil 4.5.	Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, etilasetat ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin miktarının gallik asite göre karşılaştırılması grafiği	45
Şekil 4.6.	Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, etilasetat ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarının askorbikasite karşı $H_2O_2$ süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümü karşılaştırmalı grafiği	45
Şekil 4.7.	Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarının deoksiriboz yöntemi ile OH radikal temizleme antioksidan aktivite ölçümü karşılaştırmalı grafiği	46
Şekil 4.8.	Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarının deoksiriboz yöntemi ile $OH^{\cdot}$ radikal temizleme antioksidan aktivite ölçümü karşılaştırmalı grafiği	46
Şekil 4.9.	BHT, $\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 30-60-90 dk aralıklarında $\beta$ -karoten beyazlatma % inhibisyonu antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması sütun grafiği	47
Şekil 4.10.	$\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 15-90 dk aralıklarında $\beta$ -karoten beyazlatma % inhibisyonu antioksidan aktivite ölçüm testinin	48

## karşılaştırılmalı çizgi grafiği

Şekil 4.11.	Su ve Etilasetat ekstraktları için jel görüntüsü	48
Şekil 4.12.	DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etilasetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları grafiği	49
Şekil 4.13.	Etanol Metanol ekstraktları için jel görüntüsü	49
Şekil 4.14.	DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etanol ve metanol ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları grafiği	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Flavonoid sınıflarına ait bileşikler, süstitüsyon konumları ve besin kaynakları	14
Çizelge 3.2.	Sıklıkla kullanılan elektroforez tamponları	38
Çizelge 4.1.	DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etilasetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları	66
Çizelge 4.2.	DNA 'da oksidatif hasar oluşturma etanol ve metanol ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

$\mu$ L: mikrolitre

kg: kilogram

L: litre

mg: miligram

mL: mililitre

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

$O_2^{\cdot -}$ : Süperoksit radikali

$HO^{\cdot}$ : Hidroksi radikali

$HO_2^{\cdot}$ : Hidroperoksi radikali

$ROO^{\cdot}$ : Peroksi radikali

$RO^{\cdot}$ : Alkoksi radikali

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GSSG-Rd: Glutatyon redüktaz

ABTS: 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit

BHA: Bütillenmiş hidroksianisol

BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen

TCA: Trikloro asetik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(redükte)

NER: Nükleotit eksizyon tamiri

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

$H_2O_2$ : Hidrojen peroksit

HIV: Human immundeficiency virüs

-OH: Hidroksil

$OH^{\cdot}$ : Hidroksil radikali

SOD: Süperoksit dismutaz

Troloks: 6-Hidroksil-2,5,7,8-Tetrametil Kroman-2-Karboksilik asit

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

## 1.GİRİŞ

Bilindiği gibi doğada bulunan birçok bitki, tıbbi ve kimyasal olarak oldukça değerli olup, günümüzde hastalıklardan korunma ve hastalıkları tedavi amacı ile çeşitli bitkilerden yararlanılması giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, bitkilerle ilgili çalışma sonuçlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak ROT ( Reaktif Oksijen Türleri) oluşur [1]. ROT oluşumu ile organizmanın yapısal ve fonksiyonel biomolekülleri oksidatif stres altına girer. Organizmada oksidatif sitrese yanıt olarak endojen antioksidan sistemin aktivitesi artar. Prooksidan / antioksidan denge fizyolojik koşullarda bile prooksidan lehinde olduğundan, organizmada sürekli olarak belirli bir ölçüde oksidatif stres vardır [2,3]. Reaktif Oksijen Türleri (ROT), çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R<sup>•</sup>), peroksit radikalleri (ROO<sup>•</sup>), alkoksi radikalleri (RO<sup>•</sup>), tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>), sülfenil radikalleri (RSO<sup>•</sup>) ve tiyil peroksit radikalleri (RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar [4,5].Organizmada serbest radikal oluşturan olayların başında, mitokondriyal elektron transportu, ksenobiyotiklerin metabolizması ve biyokimyasal yıkım reaksiyonları gelir [6]. Eksojen kaynaklar ise anti-neoplastik ajanlar, alışkanlık yapan maddeler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, ilaçlar, radyasyon (X ray, gamma, parçacık radyasyonu) ve strestir [4]. Reaktif oksijen türlerinin ana kaynağının süperoksit radikali olduğu, onun da ana kaynağının mitokondri olduğu düşünülmektedir [7]. Çünkü mitokondride oksijene her seferinde sadece bir elektron transfer edilebilmesinden dolayı, elektron transferi sırasında süperoksit radikali oluşumu kaçınılmazdır. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (süperoksit), dismutasyon reaksiyonu ile bir başka reaktif oksijen türü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'i oluşturur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise reaktivitesi yüksek olan OH<sup>•</sup> radikali oluşturma potansiyeline sahiptir. Mitokondride yaşla beraber istikrarlı bir şekilde O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretim hızı da artar [4].

Oksidatif stres altındaki biomoleküller okside olarak fonksiyonel dejenerasyona uğrarlar [8]. Lipidler, karbonhidratlar, proteinler gibi DNA da ROT'e maruz kalır. Oksijen radikallerinin oluşumundaki artış, antioksidan enzim düzeylerinde veya DNA onarım mekanizmalarında bozukluk olması durumunda oksidatif DNA hasarının artması kaçınılmaz olur [9]. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA da tek ve çift dal

kırıkları, abazik alanlar, proetin-DNA çapraz bağlanmaları ve oksidatif baz hasarı gibi lezyonlar meydana gelir [8]. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır [10]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir.  $Cu^{2+}$  iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz "Guanin" dir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı "8OHdG"dir. 8OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir "biomarker"ı olarak kabul edilmektedir [11].

Antioksidanlar, hücelere zarar veren bu reaktif oksijen ve azot türlerini, etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu zararlı bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları hayatın vazgeçilmez bir parçası haline getirmektedir [12].

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [13].

M.Ö. 3000 yıllarında kullanılmaya başlanan şifalı bitkiler, 1900'lü yıllarda modern tıbbın gelişmesiyle popüleritesini kaybetmeye başladı. Yerini büyük ölçüde kimyasal ilaçlara bıraktı ve alternatif bir tıp dalı olarak anılmaya başladı. Yıllar geçtikçe kimyasal ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla ve modern tıp ilaçlarının hala birçok hastalıkta tam bir başarı sağlayamaması nedeniyle bitkisel ilaçlara dönüş başladı [14].

Anadoluda özellikle Malatya ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen bir meyve olan kirazın ekonomik yararlılığını ve ürün çeşitliliğini arttırmanın yollarından biri de, kiraz yan ürünlerini daha verimli olarak değerlendirmektir. Bu bakımdan kiraz yaprağının çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla yapılacak çalışmalar bölgemizin kalkınmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmayla, kiraz yaprağının farklı ekstraktlarından elde edilen antioksidanların radikal süpürme aktivitesinin incelenmesine ve bunların oksidatif DNA hasarı üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR

### 2.1. Kiraz ve Kiraz Yaprağı

Kiraz (*Prunus avium* L.) Rosaceae familyasından bir meyve olup anavatanı Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölgedir. Dünya üzerinde yaklaşık olarak 1500 kiraz çeşidi yetiştirilmektedir Nisan-mayıs aylarında, demet halinde pembemsi beyaz renkli çiçekler açan, kırmızı, etli ve sulu meyveleri olan bir ağaçtır. Meyveler, dallarda iki veya üçü bir arada demetler halinde bulunur ve iyice kızarıp olgunlaşınca toplanır. Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip kiraz üretiminde, Türkiye ön sıralarda yer almaktadır. Çoğu meyve türlerinde olduğu gibi, kirazın da kültürünün yapıldığı en eski yer Anadolu' dur.

Kiraz yaprağı üzerine bilimsel çalışmalar yok denecek kadar azdır. Kiraz yaprakları almaşlı (spiral) bir dizilişte, eliptik, oblong veya ovate şeklinde, uç kısmı dar ve sivri, kenarları çift testere dişlidir [115]. Kiraz yaprağı Anadolu' da özellikle Malatya' da fazlaca tüketilen bir üründür. Yapraklar çıktıktan iki hafta sonra sarma yapılarak yenir. Kiraz Yaprağı Sarması Malatya mutfağının vazgeçilmez geleneksel yemeklerinden biridir.



Şekil 2.1. Kiraz yaprağı ve meyvesinden bir görünüm

## 2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan ve genellikle çok reaktif olan kimyasal maddelerdir. Bir atom veya molekül bir orbital üzerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyorsa radikal olarak tanımlanır. Normalde kimyasal olarak bağlanmış iki veya daha fazla elektron içeren moleküllerin elektron düzeni, stabilitelerini belirler. Eğer elektronun eşi yoksa molekül son derece reaktif davranır ve stabil konuma geçmek için bir elektronla çift oluşturma eğilimi gösterir [19]. Reaktif oksijen türleri (ROT) ise kimyasal olarak reaktif, bir veya daha fazla oksijen atomu içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri serbest radikalleri ve biyolojik molekülleri okside edebilen radikal olmayan reaktif bileşikler kapsar. Bu nedenle reaktif oksijen türleri aynı zamanda oksidanlar veya prooksidanlar olarak da ifade edilmektedir [18]. Günümüzde yapılan araştırmalar alzheimer, parkinson, hungtington gibi nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere, arteroskleroz, diyabet, romatoid arterit, yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar otoimmün hastalıklar ve çeşitli kanser türleri gibi birçok önemli hastalığın oluşumunda serbest radikallerin büyük bir rolü olduğunu göstermektedir [16,17].

### 2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler

Serbest radikaller endojen veya eksojen kaynaklı olabilir.

Eksojen Kaynaklar:

Radyasyon Alkol ve uyuşturucular Çevresel ajanlar: (ksenobiyotikler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar gibi). [4]

Endojen Kaynaklar:

1. Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamında oksido-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen küçük moleküller serbest radikal oluşturabilirler. Örneğin; tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, flavoproteinler, tetrahidropridinler ve antibiyotikler.
2. Enzimler ve Proteinler: Bazı enzim ve proteinler de katalitik döngüleri sırasında serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup, normalde Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NAD) bağımlı dehidrogenaz olarak etki

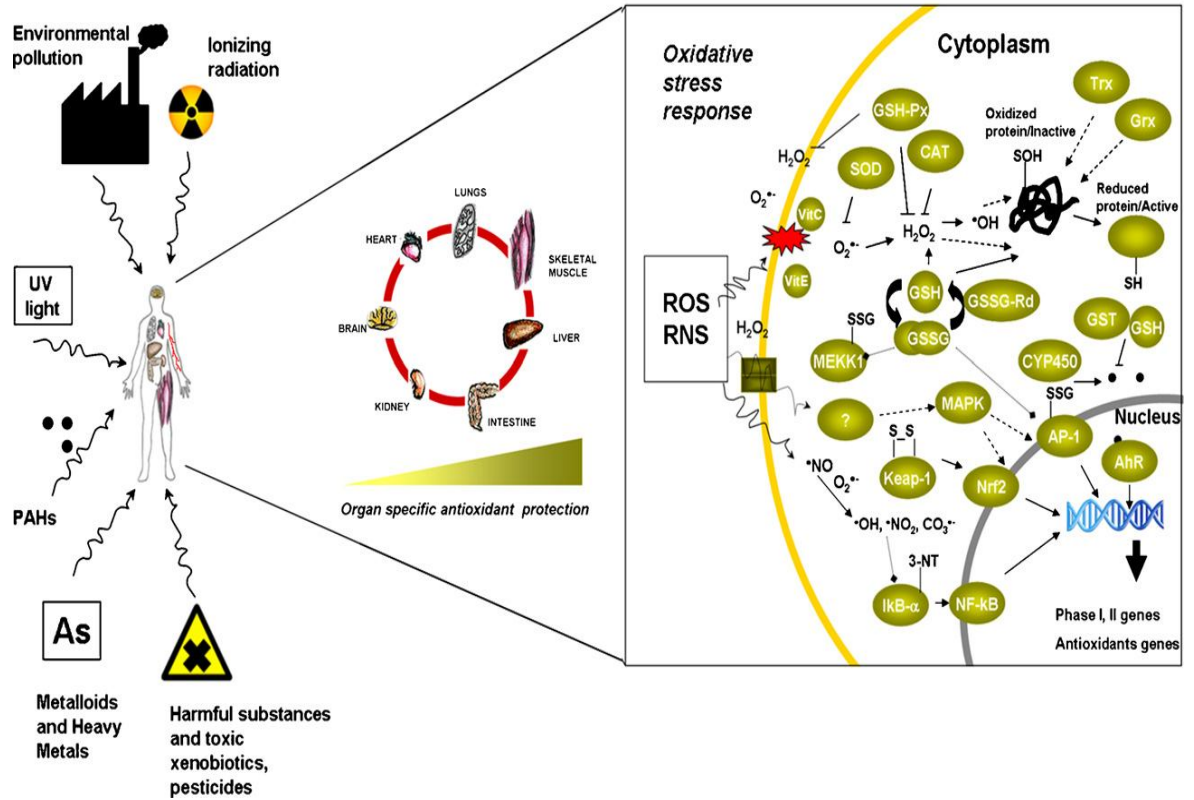
eder ve herhangi bir radikal oluşumuna neden olmaz. Fakat, invivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşümüne ve süperoksit radikalının oluşumuna neden olur

3. Mitokondrial elektron transportu.

5. Peroksizomlar

7. Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon gibi.

8. Geçiş metal iyonları: Özellikle demir ve bakır radikal oluştururlar [21, 22].



Şekil 2.2. Oksidatif hasarı artıran çevresel faktörler [20].

### 2.2.2. Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

Süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron kabul etmesi ile oluşur. Oksijen toksisitesinin temel nedenidir. Diğer radikallerin oluşması süperoksit radikalının birikmesine bağlıdır. Süperoksit radikali en kolay ve en çok oluşan radikaldir ama aktivitesi düşüktür [23]. Ancak diğer radikallerin oluşmasına yol açması bakımından önemlidir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum

zincirinde elektronca zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelir. Süperoksit radikali ksantin oksidaz ve bir grup flovoenzimler tarafından oluşturulmaktadır [24].

### **2.2.3. Hidrojen Peroksit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Hidrojen peroksit radikali oksijen molekülüne iki adet elektron eklenmesi ile oluşur. Süperoksit radikali sulu ortamlarda dismutasyona uğrayarak hidrojen peroksit radikalini oluşturur [25]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali (ROS) (ROS reactive oxygen species; reaktif oksijen türleri kısaltması) olan OH<sup>•</sup> radikalinin oluşumunu sağlar. [24].

### **2.2.4. Hidroksil Radikali (•OH)**

Hidroksil radikali oksijen molekülüne üç elektron eklenmesi ile oluşur. (OH<sup>•</sup>) biyolojik sistemlere diğer ROT' lardan daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir [24]. OH<sup>•</sup> radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir [26]. Lipit peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve hemen her organik molekülü, ayırım yapmadan okside edebilir [27].

### **2.2.5. Singlet Oksijen**

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur [30].

## **2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri**

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- a) DNA' nın tahrip olması,
- b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,

- d) Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir [31].

### **2.3.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri**

Hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan) poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijenradikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonu, biyolojik zararın özelliklerinde ciddi hücre hasarlarına yol açan değişiklikler yaparak hastalık patogenezinde önemli bir rol oynarlar [4,25]. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [32].

### **2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri**

Serbest radikaller aminoasitler ile reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karboksil gruplarının oluşumuna yol açarlar. Bu durum, protein yapısındaki enzimlerin spesifik aktivitesini ortadan kaldırır [4]. En çok etkilenen aminoasitler sülfür içerenlerdir [24]. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonlar bozulmaktadır. Protein yapısındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir [4].

### **2.3.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri**

Stabil bir molekül olan DNA’ da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA’nın günde  $10^3$  kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür [10]. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır [33]. ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır [34, 35]. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’ da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları, şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma meydana gelmektedir [34,35]. Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde  $10^4$  kez meydana gelebilmektedir [10].

### **2.3.4. Reaktif Oksijen Türlerin Bağışıklık Sistem Üzerindeki Etkileri**

ROT’ e maruz kaldığı taktirde, bağışıklık sistemdeki hücrelerde, hücreler arasındaki iletişimi yapan bazı reseptörlerin kayıp olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, serbest radikallerin hem hücre içerisindeki iletişimi, hem de diğer hücrelerle bağlantıları olumsuz şekilde etkilediği bildirilmiştir. T-Hücre tepkilerde gecikme, antikor üretiminde azalma ve enfeksiyonlara karşı direncin düşmesi gibi etkiler gözlenmiştir. [36].

### **2.3.5. Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Koruma Mekanizmaları**

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları yaratılmıştır. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunmadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır [37]. İnsan organizmasının sistemlerinde antioksidan kapasite ile oksijen tüketimi ve radikal üretim miktarı değerleri eşleşmektedir. Yüksek oksijen tüketimine sahip, karaciğer, beyin, böbrekler yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahiptir. İskelet kasları da yüksek

oksijen tüketimleri nedeniyle oldukça yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir. Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin C, E, A,  $\beta$ -karoten, metallotionin, poliaminler, melatonin, NADPH, adenozin, koenzim Q, urat, ubikinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, resveratrol, nitroksidler, GSH, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksid dismutaz, tioredoksin redüktaz, nitrikoksid sintaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz bu gruba girer [38].

## **2.4. Antioksidatif Sistemler**

Antioksidan oksidasyonu inhibe eden her hangi bir madde olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan madde, serbest radikal olan hedef molekülden bir elektron alarak veya vererek onu nötröle etmektedir. Dolayısıyla serbest radikal zincirleme reaksiyonlarını durdurmaktadır. Kendisi her durumda stabil olduğundan dolayı, serbest radikal'e dönüşmemektedir ve böylelikle etrafındaki serbest radikallerin süpürülmesi ve yok edilmesinden sorumludur [39].

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi [37].

### **2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve diet (eksojen) kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir gibi serbest radikalin meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. [40].

## 2.4.2. Doğal Antioksidanlar

### 2.4.2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bitkilerde yaygın olarak bulunan bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik halkaya sahip olan ikincil metabolitlerdir [53]. Günümüzde bitkilerde 8000'den fazla fenolik bileşiğin yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir [54]. Polifenollerin yapıları çok basitten çok karmaşığa değişebilmektedir. Örneğin fenolik asit basit bir yapıya sahipken, tanin kompleks yapıya sahip olan bir polimerdir. Polifenollerin sahip oldukları bu çeşitlilik aromatik halkaların yapısal farklılıklarına, OH gruplarının sayısına, çeşitli karbonhidratlar ve organik asitlerle yapmış oldukları bağlardan kaynaklanmaktadır [55]. Fenolik bileşiklerin, yakın zamana kadar protein, karbonhidrat ve enzimler gibi makromolekülleri bağlayarak sindirimi olumsuz şekilde etkilediği bilinmektedir.

Ancak, son zamanda fenolik bileşiklerin antioksidan kimliği, serbest radikal süpürücü özelliği ve buna ilişkin sağlık yararları gündeme gelmiştir ve sindirimi olumsuz etkilediği faraziyesini gölgede bırakmıştır [58]. Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin, içerdikleri OH gruplarından kaynaklandığı bildirilmektedir. Fenolik bileşiklerin indirgeyici, hidrojen iyonu veren antioksidan ve tekli O<sub>2</sub> emme özellikleri olduğu saptanmıştır [59]. Ayrıca, flavonoid gibi bazı fenollerin; serbest radikal emme kapasitesi, vasodilatör, anti-kanserojen, antiinflatuvar, antibakteriyel, anti-alerjik, anti-viral (HIV, herpes-simplex, influenza virüs, rhinovirüs'a karşı), estrogenik, fosfolipaz A<sub>2</sub>, siklo-oksijenaz, lipo-oksijenaz inhibitörü gibi değişik etkinliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır [55,58].

### 2.4.2.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyası

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi ile kimyasal yapıları arasında önemli bir ilişki vardır. Polifenollerin serbest radikalleri uzaklaştırıcı etkileri, B halkasındaki orto 4-C pozisyonunda OH gruplarının varlığı, C-halkasındaki 4- oxo ile birlikte C2-C3 arasında çift bağın olması, A ve C halkalarındaki 3-OH ve 5-OH veya 4'-OH ve 3'-OH gruplarının varlığından kaynaklandığı gözlenmiştir.

Çizelge 2.1. Flavonoid sınıflarına ait bileşikler, sübstütüsyon konumları ve besin kaynakları [59].

SINIFI	ADI	SÜBSTİTÜSYON KONUMLARI	BESİN KAYNAKLARI
<b>Flavanol</b>	(+)-Kateşin (-)-Epikatesin Epigallokatesin gallat	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallat	Çay Çay Çay
<b>Flavon</b>	Krisin Apigenin Luteolin	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH	Meyve kabuğu Maydonoz, kereviz Kırmızı biber
<b>Flavonol</b>	Kamferol Kuersetin Mirisetin Rutin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoz	Pırasa, brokoli, hindiba, greylfurt, siyah çay Soğan, marul, brokoli, , çay, k.şarap, mor meyveler, zeytinyağı, elma kabuğu Yabanmersini, üzüm, k. sarap , kara buğday, domates kabuğu, turunçgiller
<b>Flavanon</b>	Naringin Naringenin Taksifolin Hesperidin Eriodiktol	5,4'-OH, 7-ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'- OMe,7-rutinoz 5,7,3',4'-OH	Turunçgiller, greylfurt Turunçgiller Turunçgiller Portakal Limon
<b>İzoflavon</b>	Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4'-OH,7-glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glukoz 7,4'-OH	Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi
<b>Antosiyanidin</b>	Apigenidin Siyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3, 5-OMe	Renkli meyveler <b>Kiraz</b> , ahududu, çilek
<b>Flavanol</b>	(+)-Kateşin (-)-Epikatesin Epigallokatesin gallat	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3- gallat	Çay Çay Çay

<b>Flavon</b>	Krisin Apigenin Luteolin	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH	Meyve kabuğu Maydonoz, kereviz Kırmızı biber
<b>Flavonol</b>	Kamferol Kuersetin Mirisetin Rutin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 5,7,3',4'-OH, 3- rutinoz	Pırasa, brokoli, hindiba, greyfurt, siyah çay Soğan, marul, brokoli, , çay, k. şarap, mor meyveler, zeytinyağı, elma kabuğu
<b>Flavanon</b>	Naringin Naringenin Taksifolin Hesperidin Eriodiktol	5,4'-OH, 7- ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'- OMe,7-rutinoz 5,7,3',4'-OH	Turunçgiller, greyfurt Turunçgiller Turunçgiller Portakal Limon
<b>İzoflavon</b>	Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4'-OH,7-glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glukoz 7,4'-OH	Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi
<b>Antosiyanidin</b>	Apigenidin Siyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5- OMe	Renkli meyveler <b>Kiraz</b> , ahududu, çilek

### 2.4.2.3. Fenolik Bileşiklerin Hastalıklar Üzerine Olumlu Etkisi

Bir çok çalışma, çay, taze sebze ve meyve tüketiminin bazı kanser türlerini ve kardiyovasküler hastalık (KVH), katarakt, beyin ve bağışıklık disfonksiyonu gibi yaşa bağlı dejeneratif hastalık riskini azalttığına işaret etmektedir [60,19,61,62]. Epidemiyolojik hastalıkların bazısı, vücutta üretilen serbest radikallerin DNA ve dokulara verdiği hasarlardan kaynaklanmaktadır [63,64]. Meyve ve sebzelerde bulunan bazı vitaminler, mineraller, diyet posalar, polifenoller ve flavonoidler gibi birçok fitokimyasallar, bu hastalıklara karşı koruyucu rol oynayan öğelerdir [60].

Hayvansal çalışmalarda, diyetle polifenollerin eklenmesi ile ağız, mide, duodenum, kolon, karaciğer, akciğer gibi farklı organlarda oluşan tümör hücrelerinde azalma kaydedilmiştir. Kolon, prostat, meme ve pankreas kanserine neden olan heterosiklik aromatik aminler (HAA), et pişirme sırasında yanmış kısımda bulunmaktadır ve sitokrom P450 enzim (IA2) sistem yardımıyla aktifleşerek prokanserojen maddeler üretmektedir [66]. Sebzeler, yeşil ve siyah çayda (teaflavin, tearubigin) bulunan polifenoller, sitokrom P450 enzimin gen ekspresyonunu olumsuz şekilde etkileyerek prokarsinojenlerin oluşumunu engellemektedir ve faz II enzimleri tetikleyerek karsinojen maddelerin vücuttan atılmasını sağlamaktadır. Bu mekanizma aynı zamanda, toksik xenobiyotiklerine karşı da vücuda bağışıklık kazandırmaktadır [65,67].

Son zamanlarda alzheimer ve parkinson gibi yaş ile ilintili fonksiyonel bozukluğu olan hastalıklar çok sık olarak rastlanmaktadır. 65 yaş üzeri kişiler arasında % 15 alzheimer ve % 1 parkinson vakalarının görülmesi mümkündür [67]. Bu tür hastalıklar, beyin dokularının oksidatif strese maruz kalmasından dolayı meydana gelmektedir ve polifenol gibi antioksidanların varlığı beyin hücrelerini bu durumdan korumaktadır [32].

#### 2.4.2.4. Fenolik Bileşiklerin Riskleri

Fenolik bileşiklerin hastalıklara karşı olumlu etkilerinin yanısıra, fazla miktarda tüketimlerinin ise çeşitli zararları olduğu ve sağlık üzerinde bazı riskler taşıdığı belirtilmiştir. Hayvansal çalışmalarda tanin içeren besinin diyetle yüksek oranda bulunması, akut toksisiteye neden olurken insanlarda böyle bir duruma rastlanamamıştır. Fenolik bileşiklerin riskleri arasında, flavonoidlerin tiroid peroksidaz aktivitesini düşürerek tiroid hormon fonksiyonlarını etkilediği ve guatr oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca polifenoller, Fe<sup>3+</sup> iyonu ile şelat oluşturduğundan, bağırsaktaki non-heme Fe emilimini etkilemekte ve bireylerde anemi oluşturmaktadır. Bu nedenle çay, kahve, şarap gibi yüksek polifenol içeren sıvıların, besin ile tüketilmemesi tavsiye edilmektedir [58]. Fazla polifenollerin tüketimi, homosistinemi artışına neden olmakta ve kardiyovasküler risk taşımaktadır [68].

#### 2.4.2.5. Diyetle Fenolik Bileşiklerin Alımı

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunduğu için yeterli miktarda sebze-meyve tüketen bireylerin polifenol tüketimi 1 g/gün olarak tahmin edilmektedir [69]. ABD’de yapılan bir çalışmada fenolik bileşik tüketiminin % 16’sının flavonoidlerden, % 17’sinin antosiyaninden, % 20’sinin kateşin ve % 45’inin ‘biflavonoidlerden’ kaynaklandığı belirtilmiştir. Sebze ve meyvede bulunan en yaygın flavonoid grubun ise tahminen alınımları, 100 mg/gün olarak bildirilmiştir [70].

#### 2.4.2.6. Fenolik Bileşiklerin Emilimi

Besinlerde fenolik bileşikler glikosidler, esterler veya glikosid polimer olarak bulunmaktadır. Hidrofilik olan glikosidler ince bağırsakta emilemezler, kalın bağırsakta bulunan mikroorganizmaların yardımıyla farklı ögelere parçalanır, kısmen emilir ve enterohepatik dolaşıma girerler (70). Kalın bağırsakta, fenolik bileşiklerin parçalamaktan sorumlu iki bakteri *Eurobakterium ramulus* ve *Enterococcus casseliflavus* tespit edilmiştir. Çalışmalarda, polifenoidlerden en yaygın olan flavonoidlerin mikrobiyel hidrolizi incelenmiştir. Polifenoidlerin tüketimden sonra plazma konsantrasyonları, idrar ve safra ile atımı, polifenoidlerin doğasına ve besin kaynaklarına göre büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir [72,75]. Fenolik asitler (örneğin elma suyunda bulunan

ferulik asit) tek olarak kolayca emilir. Ancak tahıllarla alındığı zaman, emilmelerinin zorlaştığı gösterilmiştir. Flavonoid glukosidleri, ince bağırsakta sodyuma bağlı glukoz taşıyıcı (SGLT1) aracılığıyla direkt olarak emilmektedir.

#### **2.4.2.7.Antioksidanların Etki Mekanizması**

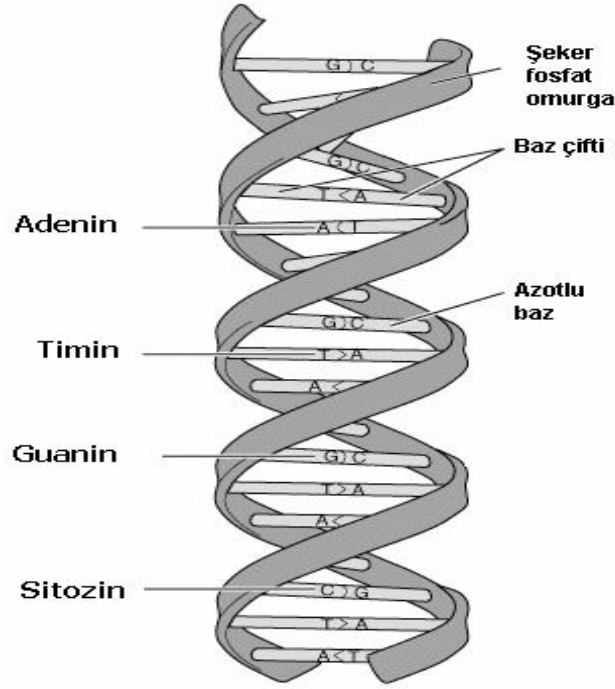
Antioksidanlar etkilerini 6 değişik mekanizma ile gösterirler;

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
2. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunu önleyebilirler.
3. Anahtar rol oynayan süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırırlar.
4. Hidroksil, alkoksil, peroksil radikallerini temizleyebilirler. Peroksitleri alkol gibi nonradikal ürünlere dönüştürerek etkilerini gösterebilirler. Örneğin; glutatyon peroksitaz, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.
5. Başlamış olan oksidan dönem zincirini kırarlar. Zincir oluşumuna neden olan serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonusalınımını önleyebilirler.
6. Membran lipitlerine etkileyerek peroksit oluşturabilen tekil oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler [74].Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler .
  - 1- Toplayıcı etki (scavenging etki) : Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir.
  2. Bastırıcı etki (quencher etki) : Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
  - 3- Onarıcı etki (repair etki)
  - 4- Zincir kırıcı etki (Chain breaking etki) : Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller zincir kırıcı özellik gösterirler.

### 2.5.1. DNA Yapı ve Fonksiyonu

İnsan somatik hücrelerinde tüm genom iki kopya olarak bulunmaktadır. Genomu oluşturan çift sarmal biçimindeki DNA, yaklaşık 3 milyar baz çifti içerir. İnsan DNA'sı 23 çift (46 tane) kromozoma bölünmüş şekilde bulunur. Bunlardan işlevsel proteinleri kodlayan gen sayısı yaklaşık 20-30 bindir. Bu genler embriyogenez, büyüme gelişme, üreme ve çeşitli metabolik işlevleri denetlerler. Genomdaki işlevsel gen sayısı, tüm genomun yaklaşık %10'u kadardır. Diğerleri genomda çok sayıda benzer kopyalar (yineleyen diziler) şeklinde dağılmıştır. Bu diziler binlerce, bazen milyonlarca kopya oluşturabilir. Bunların işlevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bazıları genlerin ekspresyonunda ve kromozomların yapılışması ve işlevlerinde rol oynayabilir [76,77].

DNA, polimerik bir nükleik asit (NA) makromolekölüdür (polinükleotid). Baz, fosfat ve şekerden oluşan bileşimler nükleotid olarak bilinir. DNA makromolekülünün temel taşları; şeker (deoksiriboz), dört farklı baz (adenin, guanin, timin, sitozin) ve fosfat grubundan oluşur (Şekil 2.3). Nükleotidler 5' ve 3' fosfodiester bağları ile birleşerek polinükleotid makromoleküllerini oluştururlar. İnsandaki genetik bilgi, DNA molekülündeki dört farklı bazın sıralanışı ile kodlanmıştır. DNA'nın yapısı, genetik bilginin ana hücreden yavru hücreye aktarılmasını ve proteinlerdeki aminoasitlerin nasıl dizileceğini belirler. Çift sarmal biçimindeki DNA zincirinde birbirine zıt yönde ilerleyen iki polinükleotid zinciri vardır. Bu zincirlerde adenin (A), timin (T), ile, guanin (G) ise sitozin (C) ile karşılıklı gelecek şekilde sıralanır ve bu zincirlerden birindeki baz sıralanışı biliniirse öteki zincir de okunabilir. Hücre bölünmesi sırasında iki zincir birbirinden ayrılır ve yavru hücreye geçen her zincir ortamdaki nükleotidleri kullanarak kendi eşini tamamlar. Mitoz bölünmede yavru hücre ile ana-baba hücrenin kromozom sayısı eşittir. Mayoz bölünmede ise atasal kromozomun yarısına sahip yavru hücreler oluşturulur, böylece her DNA kopyasından bir tane konmuş olur. Diploid organizmalarda bilgi azalması olmamaktadır [77,78].



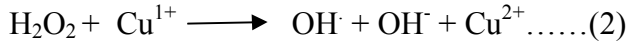
Şekil 2.3. DNA' nın yapısı

### 2.5.1.1. Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Önemi

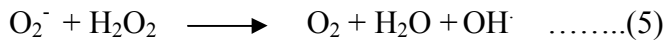
Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde  $10^3$  kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür [10]. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları, şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilmektedir [11,35]. Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde  $10^3$  kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır [32].

### 2.5.1.2. DNA' da Oksidatif Hasar Mekanizmaları

DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır [79]. "Fenton Kimyası" hipotezinde OH radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur. OH radikalının DNA üzerinde etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan OH radikalının hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Fenton ve Haber Weis reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.



(1, 2, 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar Fenton reaksiyonlarıdır)



(5 numaralı reaksiyon Haeber Weis reaksiyonudur)

[80].

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Fe<sup>2+/3+</sup> ve Cu<sup>1+/2.</sup> iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hedefi haline getirmektedir [10]. DNA'ya bağlı metal iyonları ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH radikalleri, OH radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir [81]. Doku kültür ortamının Fe<sup>3+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> iyon konsantrasyonunun arttırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir. OH radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) çok daha seçicidir. (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dal kırığından daha çok,

guanin türevi ürünler olan 8-hidroksi-guanin oluşturmaktadır [82]. Hücrede DNA ile birlikte bulunan  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının bazı fenollerle reaksiyonlaşması ile ROM oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA bazfenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir [83]. Oksidasyona uğrayan lipidler de, serbest radikal oluşturarak hücrel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferel proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil ( $\text{LO}^\cdot$ ) ve lipid peroksil ( $\text{LOO}^\cdot$ ) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine, OH radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir. Ayrıca lipid radikalleri de ( $\text{O}_2^\cdot$ ) gibi OH radikallerinden daha özgün davranır ve tercihen guanin bazına etki eder [84].

### 2.5.1.3. DNA` da Oksidatif Hasar İle Oluşan Bazı Lezyonlar

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nukleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak "*hasarlı dal onarıcı enzimlerle*" onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir (86). OH radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır (85). DNA'nın replikasyonu veya onarımı sırasında da bazlar oksidasyona uğramaktadırlar. Bazı oksidatif DNA modifikasyonları somatik mutasyona yol açarak hücrenin fonksiyonlarını bozmaktadır [10].

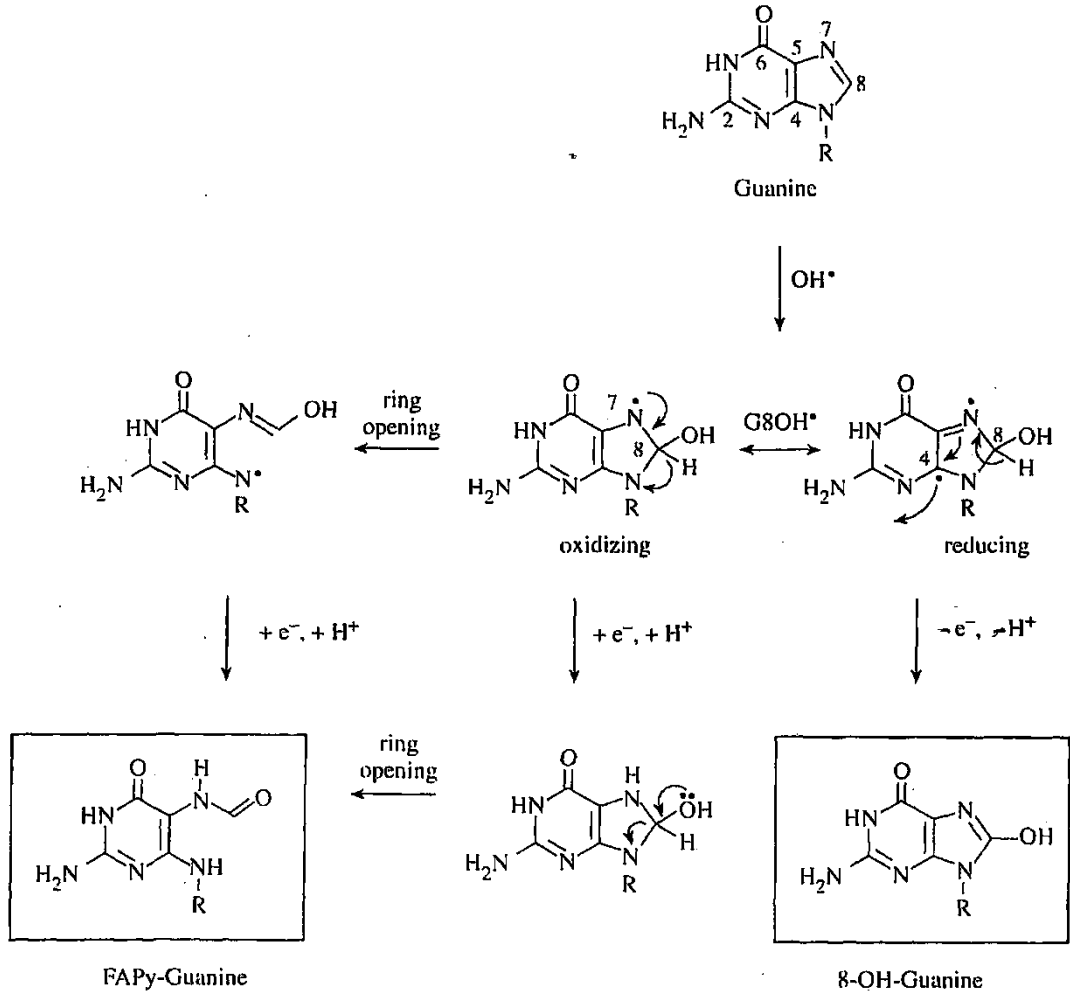
Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır. Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C4' merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. Klor merkezli radikallerin oksidasyonu ile şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker grubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluştururlar ve sonuçta zincir kırılmalarına neden olurlar. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikale moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağını kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C5' merkezli peroksil radikali oksil

radikaline dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir. Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır.

#### **2.5.1.4. 8-OHdG Oluşumu**

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir.  $Cu^{2+}$  iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz "Guanin" dir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı "8-OHdG"dir. 8-OHdG oksidatif DNA baz hasarının bir "biomarker"ı olarak kabul edilmektedir [34, 35, 10].

Hidroksil radikali, DNA'da ve diğer moleküllerde hasarlara neden olmaktadır. Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır [87]. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak ölçülmektedir. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin(8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir [88].



Şekil 2.4. 8-OHdG Oluşum Mekanizması

### 2.5.1.5. DNA Tamir Mekanizmaları

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalar DNA'larını korumak için çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptir. Memeli hücrelerinde farklı DNA hasarları farklı DNA tamir yolları ile tamir edilmektedir [89].

Canlı organizmalar, genetik materyalin bütünlüğünü korumak için “Nükleotid eksizyon tamiri” ve “Baz eksizyon tamiri” gibi çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptirler. Ultraviyole ışığının neden olduğu siklobütan pirimidin dimerleri gibi çeşitli DNA hasarları NER mekanizması, oksidatif hasarlar ise BER mekanizması ile tamir edilmektedir.

## 2.6. Beslenmenin DNA Üzerine Etkisi

Mikrobesinler (micronutrient); genellikle eser elementleri ve vitaminleri kapsar. Bugüne kadar yapılan bir çok epidemiolojik çalışma beslenme ve diyetin kanserle ilişkisini göstermiştir [21,91,92]. Kanserlerin en azından %35'inde diyet rol oynamaktadır [21,94]. İnsan diyetinde yaklaşık 40 kadar mikrobesin'e gereksinim vardır ve diyet'le en kuvvetli ilişki kurulan kanserler: yetişkinlerde kolon-rektum, prostat ve meme kanserleridir. Gelişmekte olan ülkelerde, özellikle çocuklarda görülen kanserlerde de, sosyo ekonomik faktörlerin ve beslenmenin kanserin farklı tiplerinin oluşmasındaki rolüne dikkat çekilmektedir [92]. Vitaminlerden B6, B12, folik asit, niacin, vitamin A, vitamin C ve vitamin E'nin kanserden korunmada etkili olabildiklerine dair veriler vardır [21, 94, 96]. Diyetle 8 mikrobesin eksikliğinin, (vitamin B12, folik asit, vitamin B6, niacin, vitamin C, vitamin E, Zn ve Fe eksikliği ile beraber) radyasyonun DNA da yaptığı hasara benzer şekilde, tek veya çift DNA sarmalında kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir [21]. ABD'de popülasyonun %2 ile %20'si tavsiye edilen mikrobesin dozlarının yarısından daha azını almakta ve bunların yarısında ise en az bir mikrobesin eksikliği görülmektedir.

Eser elementler özellikle Zn, Se ve Cu canlılarda bir çok biyosimik olayda rol oynarlar. Bunların en önemlileri "hücre solunumu", "DNA ve RNA yapımı", "hücre membranının bütünlüğü" ve "serbest radikallerin" giderilmesidir [96]. Böylece Zn, Se ve Cu, yaşlanmadan kansere kadar değişen geniş bir spekturumda rol oynayan serbest radikalleri enzim sistemleriyle tahrip ederler. Oksijen radikallerinin olumsuz etkilerinin bertaraf edilmesi, hücre membran bütünlüğünü sağlayarak kanser riskini azaltır ve yaşlanmayı da yavaşlatabilir [96, 97]. Öte yandan incelenen çeşitli yetişkin kanser tiplerinde, hatta çocukluk kanserlerinde öncelikle kanda Zn ve Se' un düşük olduğu gösterilmiştir. İleri evrelerde ise Cu genellikle yükselmektedir [29, 98, 99]. Ayrıca mikrobesinlerin; tümör gelişimini, tümörün başlangıç fazında inhibe ettiği, genotoksik simik ajanlardan ve virüslerden organizmayı koruduğu gösterilmiştir [91, 96]. Özetle mikrobesinler, belli başlı bir kaç mekanizmayla kanser oluşumunu engellemekte etkili olabilmektedirler [100].

## 2.7. Kaynak Özeti

Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [13]. M.Ö. 3000 yıllarında kullanılmaya başlanan şifalı bitkiler, 1900'lü yıllarda modern tıbbın gelişmesiyle popülaritesini kaybetmeye başladı. Yerini büyük ölçüde kimyasal ilaçlara bıraktı ve alternatif bir tıp dalı olarak anılmaya başladı. Yıllar geçtikçe kimyasal ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla ve modern tıp ilaçlarının hala birçok hastalıkta tam bir başarı sağlayamaması nedeniyle bitkisel ilaçlara dönüş başladı [14]. Kiraz yaprağı üzerine bilimsel çalışmalar yok denecek kadar azdır. Kiraz yaprağında bulunan antioksidanların DNA hasarı üzerine koruyucu etkisi ile ilgili bilimsel çalışmaya uluslararası bilimsel literatürde rastlanmamıştır. Kiraz yaprağı Anadolu' da özellikle Malatya' da fazlaca tüketilen bir üründür. Yapraklar çıktıktan iki hafta sonra sarma yapılarak yenir. Kiraz Yaprığı Sarması Malatya mutfağının vazgeçilmez geleneksel yemeklerinden biridir. İşte bu yüzden bizde çalışmamızı yöremizde fazlaca tüketilen bu ürün üzerine yaptık. Bitkiler üzerine daha önce yapılan bilimsel çalışmalarda bitkilerin meyve ve yapraklarının antioksidan aktivitelerine bakılmış [117] ve bunların DNA hasarı üzerine yaptıkları koruyucu etkileri gözlemlenmiştir.

Ara Kirakosyan vd kiraz ürünlerinin çeşitli reçellerinde bulunan toplam antosiyanin ve toplam fenolik bileşik miktarına HPLC ile bakmışlar ve toplam antosiyanin;  $722 \pm 87 \mu\text{g/g}$ , toplam fenolik bileşik miktarı;  $2541 \pm 371 \mu\text{g/g}$  olarak bulmuşlardır [117].

Mathew ve Abraham, tarçın bitkisinin kabuk ekstraktında (2006a) ve yaprak ekstraktında (2006b) yaptıkları iki ayrı çalışma ile bu bitkinin antioksidan aktivitesi ve yakalama etkisini, çeşitli antioksidan maddelerle karşılaştırarak (Troloks, BHA ve askorbik asit) incelemiştir. Araştırmacılar toplam fenolik madde tayin metodunun (Folin-Ciocalteu) yanı sıra 7 farklı antioksidan aktivitesi yönteminden (DPPH, ABTS, süperoksit anyon yakalama, indirgeme potansiyeli, metal şelatlama aktivitesi, linoleik asit emülsiyon sistemi ve hidroksil radikal yakalama) yararlanmışlardır. Çalışma sonunda bitkinin kabuk ekstraktında %90 radikal yakalama aktivitesi, %88 linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu ve %96 ABTS radikali yakalama aktivitesi bulunmuş ve aynı analizlerin sonuçları yaprakta sırasıyla %82, %82 ve %92 olarak tespit edilmiştir [101]. Caillet vd. (2006), yaptıkları çalışmada birçok bitkisel ürünün su ve etanolik

ekstraksiyonunda antioksidan aktivitesini hidroksil radikal yakalama yöntemiyle ve ayrıca çözgen sistemlerinin etkinliğini incelemiş, adaçayı ve nanenin çoğu ticari kimyasal gıda katkısından daha yüksek oranda antioksidan aktivite içerdiklerini ortaya koymuşlardır (%70,4 ve %71,7) [113].

Wang ve Lin (2000), böğürtlen, ahududu ve çileğin meyvesi ve yapraklarında yaptıkları çalışmada, örneklerin antioksidan aktivitelerini, toplam fenolik madde miktarı için Folin-Ciocalteu, antioksidan kapasitesi için ORAC yöntemlerini kullanarak belirlemiş, meyve ve yaprak kısımları arasındaki aktiviteyi, elde edilen sonuçlar doğrultusunda karşılaştırmıştır. Meyvelerinin yüksek oranda antioksidan aktivitesi içeriğine sahip olduğu bilinen bu bitkilerin yapraklarında da kayda değer oranda aktivite olduğunu ortaya konulmuştur [52].

Brahma N.ve arkadaşları moringa oleifera bitkisinin DNA hasarı üzerine koruyucu etkisine bakmışlar ve % 20' ye kadar koruyucu etki gözlemlemişlerdir [115].

Sevil Emen ve arkadaşları *Cyclotrichium niveum* bitkisinin etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesine ve DNA hasarı üzerine koruyucu etkisine bakmışlar; yüksek antioksidan aktivite ve %90' a kadar koruyucu etki gözlemlemişlerdir.

Murat Kızıl ve Bircan Çeken bazı *hypericum* ve *achillea* bitki türlerinin etanol ekstraktlarının DNA' yı serbest radikallerden koruma etkilerini araştırmış; pBluescript M13+ plazmid DNA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fotolizi sonucu oluşan OH radikallerine ile etkileşmesi Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmiş, bitki ekstraktlarının 100-400 µg/mL konsantrasyon aralığında DNA'yı OH radikallerine karşı koruma etkisine bakılmış, *Hypericum* bitki ekstraktlarının plazmid DNA'yı hidroksil radikallerinin neden olduğu kesimine karşı 84-99 % koruduğu gözlenmiştir. *Achillea* bitki ekstraktlarının ise DNA kesimini 67-98 % oranında önlediği tespit edilmiştir [116].

Anadoluda özellikle Malatya ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen bir meyve olan kirazın ekonomik yararlılığını ve ürün çeşitliliğini arttırmanın yollarından biri de, kiraz yan ürünlerini daha verimli olarak değerlendirmektir. Bu bakımdan kiraz yaprağının çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla yapılacak çalışmalar bölgemizin kalkınmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmayla, kiraz yaprağının farklı ekstraktlarının antioksidanların radikal süpürme aktivitesinin incelenmesine ve bunların oksidatif DNA hasarı üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

### **3. ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Materyal**

Yaptığım çalışmanın deneysel kısmında kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

##### **3.1.1. Araç Gereçler**

Deneylerde, Memmert (WBU 45) ısıtıcı, İka (RV 05 Basic 1B) Rotari Evaporatör, Heraeus (Fuktion Line) etüv, Shimadzu (AX 200) 0,0001 duyarlılıkta terazi, Hana (HI 190M) magnetik karıştırıcı, Hana (pH 211) pH metre, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, Shimadzu (UV-1601) Spektrofotometre, Heidolph (Reax Top) vorteks, santrifüj cihazı (Minstral 1000), Hettich (Universal 32R) santrifüj, Brand (transferpette) otomatik pipetler, teknik (B8) distile su üretme cihazı, 3 ml-disposable küvet (Pharmacia LKB Novaspec II), Whatman filtre kağıdı, parafilm, eppendorf tube (Biorad), Jel görüntüleme sistemi (Bio Rad Gel Doc XR), elektroforez cihazı (Biorad) Otoklav cihazı (Hıyarama), bilender (Arçelik) kullanıldı.

##### **3.1.2. Kimyasallar**

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler; pBR322 supercoiled plasmid DNA(Vivantis), Agarose (Vivantis), Ethidium bromide (Vivantis), Tris-Borat-EDTA Jel tamponu (Vivantis), Bromophenol blue (Vivantis), EDTA (Vivantis),  $\beta$ -Mercapto ethanol (Merck),  $MnCl_2$  (Merck), BHT (Safe), Ferrozine (Fluka), Iron chloride tetrahydrate (Merck), Sodyum thiosulfate (Merck), Amonyum molibdat tetrahydrate (Sigma), Sulfuric acide (Merck), 2-Deoxy-D-Ribose (Alfa Aesar), Aluminum chloride hexahydrate (Sigma Aldrich), Sodium nitrite (Sigma Aldrich), Sodium carbonate decahydrate (Sigma Aldrich), trolox (Sigma Aldrich ),  $\alpha$ -tokopherol (Sigma Aldrich), Ethanol (Sigma Aldrich ) Methanol (Sigma Aldrich), Etilasetat (Sigma Aldrich ), DPPH (2,2-Diphenyl-1-pirilhidrazil) (Sigma), Tween 20 (Sigma), Trikloroasetik asit (Alfa Aesar), Demir (III) klorür (Merck), Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel), Hidrojen

peroksit (Sigma Aldrich), Linoleik asit (Sigma), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6sulphonic acid) (Fluka),  $K_3Fe(CN)_6$  (Fluka), Linoleik asit (Sigma), Metanol (Fluka), Trans-beta-karoten (Sigma), Kloroform (Merck), potasyum ferri siyanür (Merck),  $FeSO_4$  (Merck) , sodyum salisilat (Merck), temin edilmiştir.

### 3.2. Yaprakların Toplanması, Kurutulması ve Ekstraksiyonu

Yapraklar haziran ayının ilk haftası içerisinde Malatya yöresinde yetişen Dalbastı Kiraz(*prunus avium L*) Ağacı'ndan toplandı. Bir hafta içerisinde gölgede kurutuldu. Bilendırda öğütülüp ağzı kapalı poşetler içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1. Soğuk su ekstraksiyonu; 100gr öğütülmüş yaprak 2L 25<sup>0</sup>C de su ile 24 saat karıştırıldı. Kahve rengi-kırmızı renkte bir ekstrakt elde edildi. Ekstrakt süzme işlemine tabi tutuldu. Süzüntü çelik taslar içerisinde dondurulup liyofilizatörde kurutma işlemine tabi tutuldu. 2,3 gram kuru madde elde edildi. Kuruyan madde hava ile fazla temasına izin verilmeden (çünkü içerisindeki fenolik maddeler nemden etkileniyor) +4<sup>0</sup>C de buz dolabında muhafaza edildi. Not: 2 L' lik ekstraktan yaklaşık 10 gr kuru madde elde edildi.
2. Sıcak su ekstraksiyonu; 50gr öğütülmüş yaprak 1 L 100<sup>0</sup>C de su ile 24 saat karıştırıldı. Açık kahve rengi-kırmızı renkte bir ekstrakt elde edildi. Ekstrakt süzme işlemine tabi tutuldu. Süzüntü çelik taslar içerisinde dondurulup liyofilizatörde kurutma işlemine tabi tutuldu. 2,0 gram kuru madde elde edildi Kuruyan madde hava ile fazla temasına izin verilmeden (çünkü içerisindeki fenolik maddeler nemden etkileniyor) +4<sup>0</sup>C de buz dolabında muhafaza edildi.
3. Metanol ekstraksiyonu; 20gr öğütülmüş yaprak 300ml 25<sup>0</sup>C de metanol ile 72 saat karanlıkta karıştırıldı. yeşil renkte bir ekstrakt elde edildi. Ekstrakt süzme işlemine tabi tutuldu. Süzüntünün evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. 4<sup>0</sup>C de buzdolabında muhafaza edildi.
4. Etanol ekstraksiyonu; 20gr öğütülmüş yaprak 300ml 25<sup>0</sup>C de etanol ile 72 saat karanlıkta karıştırıldı. Yeşil renkte bir ekstrakt elde edildi. Ekstrakt süzme

işlemine tabi tutuldu. Süzütünün evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. 4°C de buzdolabında muhafaza edildi.

5. Etilasetat ekstraksiyonu; 20gr öğütülmüş yaprak 300ml 25°C de etilasetat ile 72 saat karanlıkta karıştırıldı. Koyu yeşil renkte bir ekstrakt elde edildi. Ekstrakt süzme işlemine tabi tutuldu. Süzütünün evaporatörde çözücüsü uzaklaştırıldı. 4°C de buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.3. Antioksidan Aktivite**

#### **3.3.1. İndirgeme Gücü Tayini**

İndirgeme gücü ölçümünde Hwang [102] vd'nin kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Cam tüplere ekstrakte edildikleri çözücülerinde de hazırlanmış 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml olacak şekilde maddelerimiz konuldu. Kontrolde örnek yerine saf su kullanılmıştır. Her tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyumferrisiyanür ilave edilerek karışım su banyosunda 50° C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 2,5 ml %10' luk trikloro asetik asit eklenip, reaksiyon durdurulmuş, tüpler çalkalanmış daha sonra santrifüj cihazının tüplerine alınan örnekler, 3000 dev/dak'da 10 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonucu ayrılan süpernatandan 1,25 ml alınarak üzerine 1,25 ml destile su ve 0,25 ml %0,1' lik FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi ilave edilmiş renklenmiş çözeltinin 700 nm' deki absorbansı köre karşı okunmuştur. İndirgeme gücü, absorbansa göre karşılaştırılmıştır.

#### **3.3.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini**

Antioksidan aktivitesi hesaplamada tercih edilen yöntemlerinin başında DPPH serbest radikal yakalama yöntemi gelmektedir. Yöntemde DPPH, antioksidan molekülleriyle etkileşerek hidrojen vererek indirgenir ve böylece absorbansın düşmesine neden olur. Absorbanstaki azalma ne kadar yüksek olursa radikal yakalama aktivitesi o kadar yüksektir[101].

Diphenyl Picryl Hydrazyl (DPPH) sentetik radikali kullanılarak maddelerin RSG değerinin ölçümü, Yen ve ark.,[105]'a göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. 20mg DPPH tartıp üzerine 100ml etanol

ekledik.UV spektrofotometrede 700nm de 0,700+/-20 absorbans değeri verene kadar çözücü eklendi. Taze kullanmaya dikkat edilmelidir. Etanol, metanol, etilasetat, sıcak su ve soğuk su ekstraları (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 µg/ml) olacak şekilde hazırlandı, spektrofotometre tüpü içerisine bu ekstraların 0,1ml'si ve üzerine 2,9ml DPPH özeltisi eklenerek karanlıkta 30 dk bekletil dikten sonra UV spektrofotometre cihazında 517 nm' de ölçüm alınıp kaydedildi. Standart olarak BHT, α-tokoferol ve trolox kullanıldı. % Süpürme gücü aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Süpürme aktivitesi RSG} = 1 - [A_{\text{Ö:30}} \div A_{\text{K:30}}] * 100$$

$A_{\text{Ö:30}}$ : Örneğin 30. dakikadaki absorbansı

$A_{\text{K:30}}$ : Kontrolün 30. dakikadaki absorbansı

### 3.3.3. ABTS Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

ABTS radikali giderme aktivitesi Re [104] vd yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Nispi antioksidan kapasitesini ABTS radikalini kullanarak ölçen bu metot hidrojen verici ve serbest radikal zincirlerini kırıcı antioksidan maddelerin aktivitesini belirlemede etkilidir. Örneklere uygulanan ABTS yöntemi sonuçları % radikal yakalama şekilde değerlendirildi. ABTS radikali; potasyum peroksodisülfat (6,6 mg) ve ABTS (30 mg)'nin 7,8 mL sulu çözeltisinin oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilmesiyle elde edildi. Elde edilen renkli çözelti etanol ile absorbansı 734 nm'de 0,700±0,020 olacak şekilde seyreltilerek için gerekli ABTS özeltisi elde edildi. 3 ml'lik küvetlere 50µl, 100µl maddeler eklenip saf suyla 100µl'ye tamamlanmıőtır. Kör numune için küvete 100 µl saf su konmuőtur. Böylece örneklerin farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltilere 2,3 ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildikten sonra köre karşı 737 nm'de absorbanları ölçülerek antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$AA = 1 - [A_{\text{Ö:30}} \div A_{\text{K:30}}] * 100$$

$A_{\text{Ö:30}}$ : Örneğin 30.dakikadaki absorbansı

$A_{\text{K:30}}$ : Kontrolün 30. dakikadaki absorbansı

### 3.3.4. OH<sup>-</sup> Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

Hidroksil radikalleri hücre membranları ve diğer biomoleküller için çok zararlı bir serbest radikaldir. Hidroksil radikallerini süpürme, hücreleri oksidatif hasardan korumada önemlidir. OH<sup>-</sup> indirgeme gücü ölçümü Smirnoff and Cumbes'a [106] göre yapıldı. Hidroksil radikalleri FeSO<sub>4</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren sisteme göre üretildi [60]. Toplam 3 ml reaksiyon karışımı için 1 ml FeSO<sub>4</sub> (1,5 mM), 0.7 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(6 mM), 0.3 ml sodyum salisilat (20 mM) ve değişen konsantrasyonlardaki örneklere (100, 200, 300 µg/ml) eklendi, ve askobik asit ilave edildi. 60 dakika 37<sup>0</sup> C'de inkübasyona bırakıldı. 562 nm'de absorbansları kaydedildi. Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$AA=[1-(A_1-A_2)/A_0]*100$$

A<sub>0</sub>: Kontrolün absorbansı

A<sub>1</sub>: Örneğin absorbansı

A<sub>2</sub>: Örneğin sodyum salisilatsız absorbans

### 3.3.5. Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Gıdaların içeriğinde bulunan toplam fenolik miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Toplam fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında genellikle tercih edilen Folin-Ciocalteu metodu, yöntem adı veren reaktif vasıtasıyla oluşan renk yoğunluğunu göre absorbans ölçümüne dayanmaktadır. Ancak metot, ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte ettiği için gıdaların yapısında bulunan bütün fenolik grupları ortaya çıkarır. Bu nedenle spesifik bir metot kabul edilmemektedir. Ayrıca metodun en önemli dezavantajı analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğramasıdır [106]. Analiz sonucunda yüksek absorbans değeri yüksek fenolik madde miktarının göstergesidir. Bitkisel ürünlerin, toplam fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında genellikle Folin-Ciocalteu (F-C) metodu tercih edilmektedir [101].

1 mg/ml olacak şekilde yaprak ekstraktlarından 40 µl alınıp 200 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırıldı. 1160 µl distile su, 3 dakika sonra 600 µl % 20'lik sodyum karbonat ( Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ) ilave edilir. Karışım 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak karıştırılır. 765 nm dalga boyunda absorbanans ölçülür. Standart olarak gallik asit kullanılır.

### 3.3.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Süpürme Kapasitesi Tayini

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tek başına bir radikal değildir, ama Fenton ve HaberWeis reaksiyonlarıyla OH<sup>-</sup> radikali oluşumuna neden olduğu için oksidatif sitreste önemli etken bir maddedir. Dolayısıyla ortamdan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzaklaştırma aktivitesi antioksidatif aktivite için belirleyici bir yöntem olabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzaklaştırma aktivitesi ölçümü için Zhao [107] yöntemi küçük değişikliklerle beraber esas alındı.

1 ml 0,1mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1 ml çeşitli konsantrasyonlarda (150, 300, 450 µg/ml) hazırlanmış örnekler karıştırılır. 100 µl % 3'lük amonyum molibdat eklenir. 2 M 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 1,8 M 7,0 ml KI ilave edilir. Karıştırılan çözelti 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile sarı renk kayboluncaya kadar titre edilir. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. % Süpürme Aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

% Süpürme Aktivitesi=(V<sub>0</sub>- V<sub>1</sub>)/V<sub>0</sub>\*100 olarak hesaplanır.

V<sub>0</sub>=Örnek yokken kontrol için harcanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı

V<sub>1</sub>=Örnek varken harcanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı

### 3.3.7. Deoksiriboz Yöntemi

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır. Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C4' merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Hidroksil radikal yakalama aktivitesinin

ölçümü deoksiriboz metoduyla yapılmaktadır. Bu yöntemle göre; düşük absorbans değeri; yüksek deoksiriboz parçalanmasının inhibisyonu anlamına gelmektedir. Yüksek oranda reaktif hidroksil, DNA, yağlar ve proteinler üzerinde oksidatif zararlara neden olabilmektedir. Hidroksil yakalama aktivitesi yüksek olan ürünler, OH grubunu nötralize edip hidrojen atomuna dönüştürerek inaktif hale getirdikleri için önemlidir [101].

Bu deney küçük değişikliklerle beraber Halliwell at al. Yöntemine göre yapıldı.[109]. Reaksiyon karışımı; bitki ekstraktı ( 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml) 50 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içindem10 mM deoksiriboz 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , 10 mM FeCl<sub>3</sub> 1 mM EDTA 10 mM ascorbik asit ile 37<sup>0</sup> C' de inkübe edilir, raksiyona 1 ml %1' lik TBA ve 1 ml %2' lik TCA ilave edilerek raksiyon durdurulur. Daha sonra tüpler kaynar sıcak su banyosunda 15 dk ısıtılır. Tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulur. Ve karışımın 532 nm' de absorbansı köre karşı ölçülür.

Karışımın absorbans miktarındaki azalma deoksiribozun oksidasyonunun azaldığını gösterir. % İnhibisyon aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (Ac - As) / Ac * 100$$

Ac= kontrolün absorbansı

As= Ekstaktların veya standartların arlığında ölçülen absorbans

### 3.3.8. β-Karoten Beyazlatma Yöntemi

Antioksidan aktivite ölçümü, Moure [56] vd göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. 2 mg kristal trans-beta-karoten, 10 ml kloroform içinde çözülerek stok beta-karoten çözeltisi hazırlanmıştır. 250 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona; 20 µg linoleik asit ve emülgatör olarak 200 µl tween-20 konularak üzerine beta-karoten çözeltisinden 1 ml konulmuş ve hızla karıştırılarak balon içeriğinin homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Kloroform rotary evaporatörde 40<sup>0</sup> C'de vakum altında 5 dakikada uzaklaştırılmıştır. Balona 50 ml destile su, yavaşça konularak ve kuvvetlice çalkalanarak tam bir emülsiyon oluşması sağlanmıştır. Bu emülsiyon ışıktan ve havadan etkilenmeyeceği soğuk bir yerde kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Bu emilsyondan 50 µg/ml örnek içeren her bir tüpe 5 ml ilave edilmiş, tüpler 50<sup>0</sup> C'de su banyosuna konulmuş, belli aralıklarla (15 dk ) 90

dakika boyunca emülsiyonların 470 nm’de absorbands ölçülerek antioksidan aktivite aşağıdaki formülle hesaplanmıştır; Kontrol için 100µl metanol kullanılmıştır. Standart olarak; trolox, α-tokoferol, BHT ve askorbik asit kullanılmıştır.

$$AA = [(A_{\text{Ö:90}} - A_{\text{K:90}}) / (A_{\text{K:0}} - A_{\text{K:90}})] * 100$$

$A_{\text{Ö:90}}$  : Örneğin 90. Dakikadaki absorbandsı

$A_{\text{K:90}}$  : Kontrolün 90. Dakikadaki absorbandsı

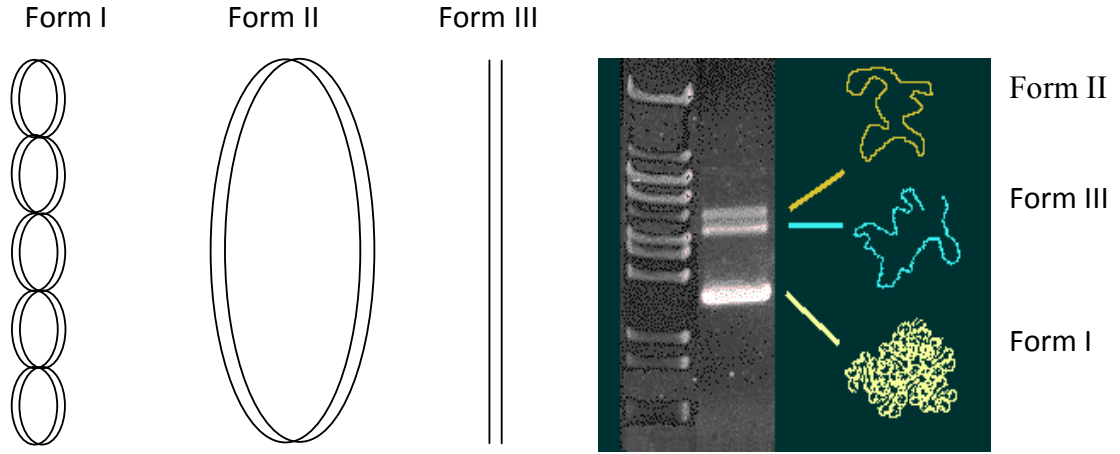
$A_{\text{K:0}}$  : Kontrolün 0. Dakikadaki absorbandsı

### 3.3.9. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir.

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroforez tekniği de bu prensibe dayanır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması, ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA’ların tanımlanabilmesi, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği teknikleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforezi tekniği, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır.

Agaroz jelde örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. DNA şeker fosfat omurgasından dolayı negatif yüklüdür ve bir elektriksel alana konulduğu zaman bu negatif yükünden dolayı anottan katoda doğru hareket eder.



Şekil 3.1. DNA'nın farklı formları

**DNA'nın Konformasyonu:** Plazmid DNA'nın üç formu vardır. **i)** Supercoiled (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I); **ii)** open circular (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II); **iii)** linear (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III) Agaroz Jel Elektroforezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir (Şekil 3.1).

**Elektroforez Tamponunun bileşimi:** DNA'nın elektroforetik hareketi elektroforez tamponunun bileşimi ve iyonik gücü tarafından etkilenir. İyonların yokluğunda elektriksel iletkenlik minimum düzeyde olduğu için DNA'nın hareketi çok yavaştır. Çok yüksek iyonik güçteki tamponun kullanılması halinde elektriksel iletkenlik çok fazladır ve çok miktarda ısı açığa çıkar. Bu durumda jel eriyebilir veya DNA denatüre olabilir. Doğal çift zincirli DNA'lar için değişik tamponlar kullanılabilir. Bunlar arasında EDTA (pH 8.0), pH'sı 7.5-8.5 olan 50 mM konsantrasyondaki Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) ya da Tris-fosfat tamponları sayılabilir. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanırlar.

Çizelge 3.2. Sıklıkla kullanılan elektroforez tamponları

<b>Tampon</b>	<b>Çalışılan çözelti</b>	<b>Konsantre stok çözelti (litrede)</b>
<i>Tris-asetat</i> (TAE)	<b>1x:</b> 0.04 M Tris-asetat 0.001 M EDTA	<b>50x:</b> 242 g trizma base 57.1 mL Glasiyel asetik asit 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
<i>Tris-fosfat</i> (TBE)	<b>1x:</b> 0.09 M tris-fosfat 0.002 M EDTA	<b>50x:</b> 540 g trizma base 77.5 mL %85 fosforik asit (1.679 g/mL) 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
<i>Tris-borat</i> (TBE)	<b>1x:</b> 0.09 M tris-borat 0.002 M EDTA	<b>50x:</b> 540 g trizma base 55 g borik asit 40 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)

#### Gerekli malzemeler

1. Mikropipet ve pipet ucu (1-20 µL)
2. Otoklav bandı
3. Elektroforez aygıtı
4. Güç kaynağı
5. Agaroz
6. Elektroforez tamponu (TAE 50x stok pH 8.0: 242 g trizma base, 57.1 mL Glasiyel asetik asit, 100 mL 0.5 M EDTA son hacim 1000 ml olacak şekilde su ilave edilir.)
7. Etidyum Bromür (10 mg/mL)
8. Yükleme tamponu [Bromfenol blue (BFB) 6x stok: % 0.25 bromfenol mavisi, %40 (w/v) sukroz(su içerisinde)]
9. Plazmid DNA örnekleri

## DENEYİN YAPILIŞI

Bu deneyde pBR322 supercoiled plasmid DNA'sı agaroz jelde yürütülmüştür.

### 3.3.9.1. DNA 'da Oksidatif Hasar Oluşturma ve Bitki Ekstraktlarının Koruyucu Özelliğinin Gözlenmesi:

A. Etanol ve Metanol Ekstraktları için;

10 Tane küçük ependorf tüpüne sırasıyla miktarları; 1. Pbr322 supercoiled plasmid DNA'sı: 200 ng 5µL 2.Fosfat tamponu: 7,14mmol 5 µL 3. Bitki ekstraktları: 2 µL 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 µL olacak şekilde konuldu.

1.DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

6. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

7. DNA + Etanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

8. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

9. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

10. DNA + Metanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

B. Sıcak su ve Soğuk su Ekstraktları için;

13 Tane küçük eppendorf tüpüne sırasıyla miktarları; 1. Pbr322 supercoiled plasmid DNA'sı: 200 ng 5µL 2.Fosfat tamponu: 7,14mmol 5 µL 3. Bitki ekstraktları: 2 µL 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 µL olacak şekilde konuldu.

1.DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

6. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
7. DNA + Sıcak su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
8. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
9. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
10. DNA + Soğuk su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
11. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
12. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
13. DNA + Etilasetat ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

Sonra UV ile gösterilen tüplerin hepsi yatay konumda ve aynı açıda olacak şekilde 4 dakika UV ışığına maruz bırakılarak ortamda bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin OH radikaline parçalanması ve plasmid DNA' da hasar oluşturması ve bitki ekstraktlarının koruyucu özelliğinin ortaya çıkması sağlandı.

### **3.3.9.2. Agaroz Jel'in Hazırlanması**

1. Elektroforez aygıtı ile sağlanan plastik tepsinin kenarları otoklav bandı ile sarılarak bir kalıp oluşturulur ve plaka yatay konumda, düzgün bir yere yerleştirilir.
2. Agaroz (1 g), 250 mL'lik bir erlen içerisinde bulunan 100 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ilave edilir ve erlen agaroz eriyene kadar kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında tutulur. ( Agaroz taneciklerinin mümkün olan en kısa sürede erimesi sağlanmalıdır.)
3. Agaroz çözeltisi 60 °C'ye kadar soğutulur. Daha sonra 1.5 µl etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edilir ve karıştırılır.
4. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya dökülür.
5. Jel donması için oda sıcaklığında 40-45 dakika bekletilir. Jel donduktan sonra tarak ve otoklav bandı dikkatle çıkarılır.

### 3.3.9.3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

1. UV' den çıkarılan eppendorf tüplerine 5 µl yükleme tamponu ilave edildi.
2. Jelin kuyucukları elektroforez tamponu ile dolduruldu ve hazırlanan DNA örnekleri uygun bir pipet ile tampon dolu kuyucuklara dikkatlice yüklendi.

A. Kuyucuklara sırasıyla aşağıdaki gibi yükleme yapıldı (Etanol ve Metanol ekstraktları için);

1.DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

6. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

7. DNA + Etanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

8. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

9. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

10. DNA + Metanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

B. Kuyucuklara sırasıyla aşağıdaki gibi yükleme yapıldı. (Sıcak su, Soğuk su ve Etilasetat ekstraktları için);

1.DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

6. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

7. DNA + Sıcak su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

8. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

9. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

10. DNA + Soğuk su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
  11. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
  12. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
  13. DNA + Etilasetat ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
3. Jel elektroforez tankına yerleştirildi ve tank maksimuma kadar Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) ile dolduruldu. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. DNA katottan (siyah uçtan) anoda (kırmızı uca) doğru hareket eder. Elektroforez 40 V'ta 500 mA akım uygulanarak 3 saat süreyle yürütüldü.
  4. Elektrik akımı kesildi, tel bağlantıları ve kapak çıkarıldı. Jel yükleme tamponları üç amaç için kullanılırlar: i) Örneğin yoğunluğunu arttırarak DNA'nın kuyucuğa düzgün olarak yüklenmesini sağlarlar, ii) Örneği renklendirerek yükleme işlemi basitleştirirler, iii) Elektriksel alanda anoda doğru hareket ederler. Jel yükleme tamponları genellikle 6x konsantre çözeltiler halinde hazırlanırlar [110, 111, 112 ].

#### 3.3.9.4. Jel Görüntüleme Cihazında DNA hasarının ölçümü

Jellerin fotoğrafını çekmek için jeli, alttan ya da üstten aydınlatan ultraviyole ışık kaynağı kullanılır.

Bu deneyde fotoğraflar Bio Rad Gel Doc XR görüntüleme sistemi ile çekilmiştir.



1

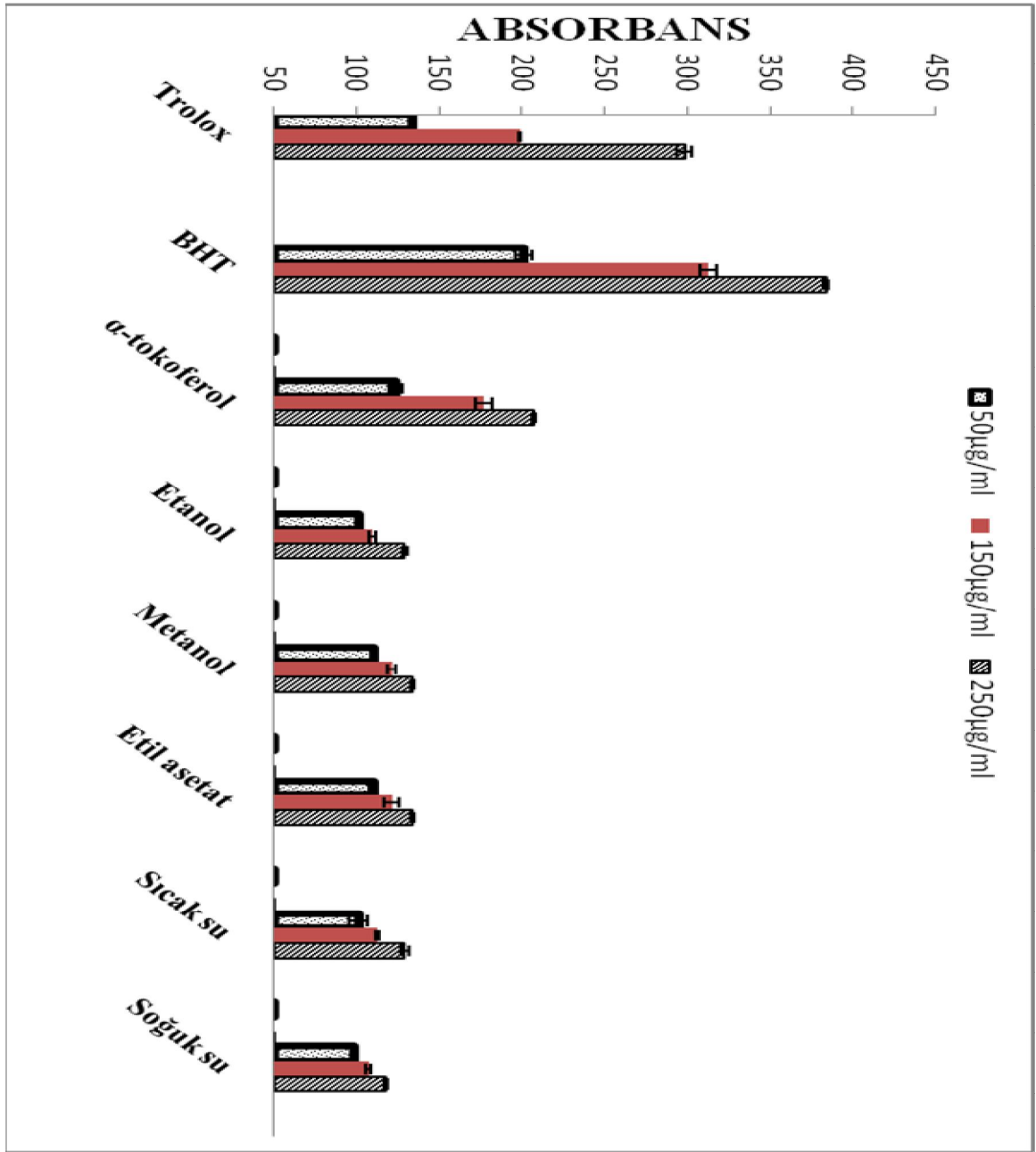


2

Şekil 3.2. Biorad Jel Görüntüleme Cihazı' ndan bir görünüm

## 4.ARAŞTIRMA ve BULGULAR

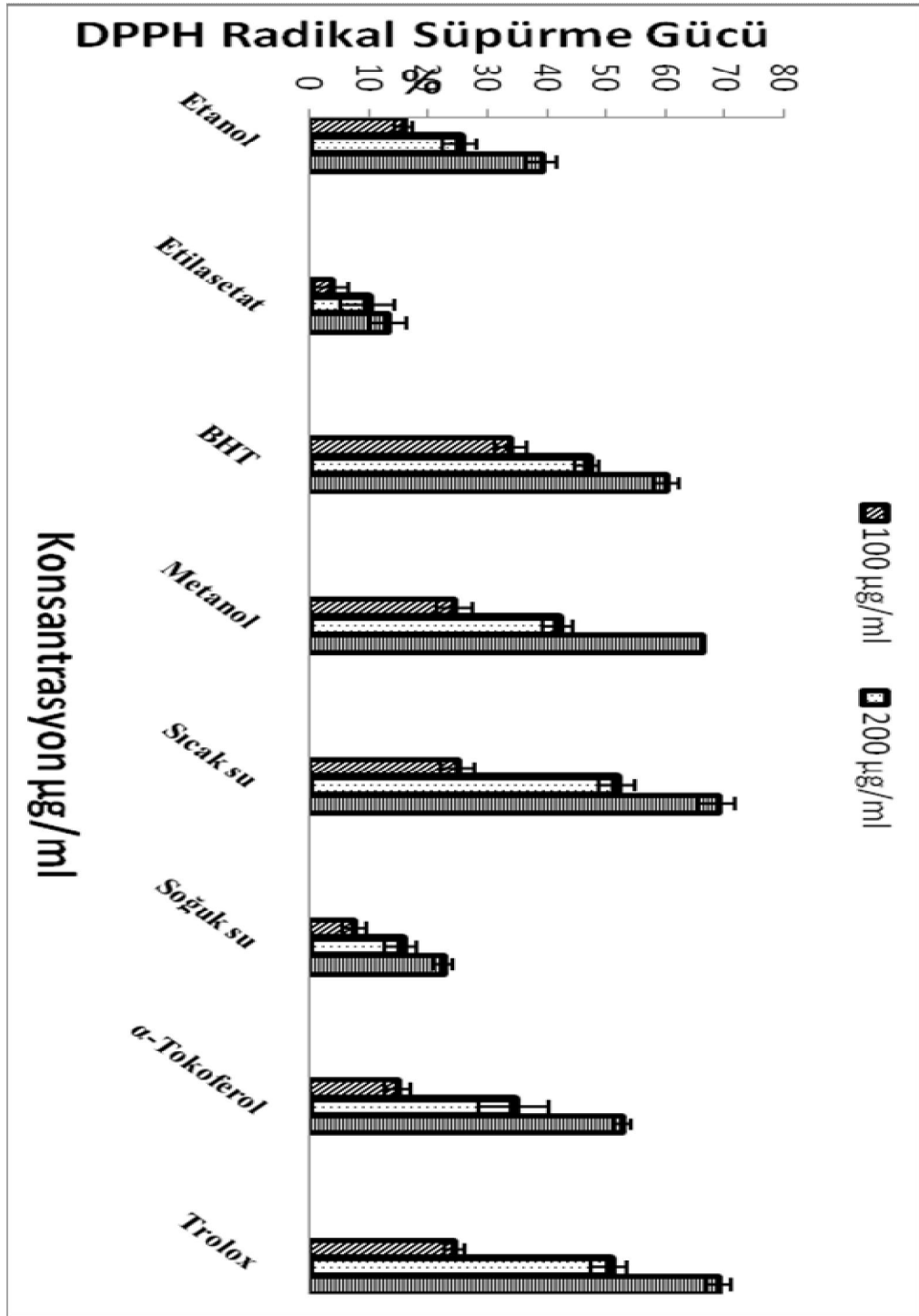
### 4.1. İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları



Şekil 4.1. Trolox, BHT, α-Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 50, 150, 250 µg/ml’de indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiğidir. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte düşük absorbans yüksek aktivite demek olduğundan standart olarak en yüksek aktiviteyi BHT 50 µg/ml'de; 200.5 abs, 150 µg/ml'de; 312.5 abs, 250 µg/ml'de; 383.5 abs lık bir aktivite gösterirken ekstrakt örneklerinde ise en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı 50 µg/ml'de; 110 abs, 150 µg/ml'de; 121 abs, 250 µg/ml'de; 133 abs, sonra etanol ekstraktı; 50 µg/ml'de; 101.5 abs, 150 µg/ml'de; 109.5 abs, 250 µg/ml'de; 129 abs, sonra sıcaqsu ekstraktı; 50 µg/ml'de; 101 abs, 150 µg/ml'de; 112 abs, 250 µg/ml'de; 129 abs, sonra soğuksu ekstraktı; 50 µg/ml'de; 98 abs, 150 µg/ml'de; 107.5 abs, 250 µg/ml'de; 117 abs, ve en son etilasetat ekstraktı; 50 µg/ml'de; 91.5 abs, 150 µg/ml'de; 100 abs, 250 µg/ml'de; 108 abs lık bir aktivite göstermiştir.

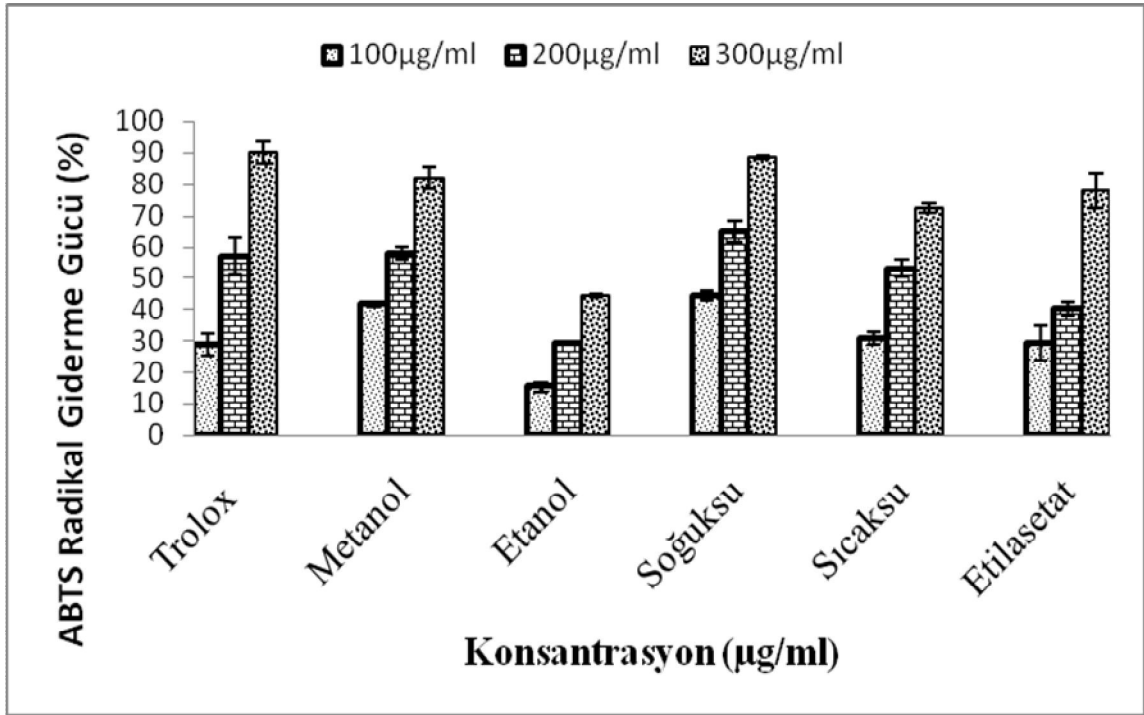
#### 4.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Sonuçları



Şekil 4.2. Trolox, BHT, α-Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200 ve 300 µg/ml'de DPPH radikal süpürme gücü karşılaştırmalı grafiği. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte en yüksek aktiviteyi standartlardan trolox, sonra  $\alpha$ -tokoferol, ve sonra BHT gösterirken, ekstraktlardan ise en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı;, sonra sıcak su ekstraktı, sonra etanol ekstraktı, sonra soğuk su ekstraktı, sonra etilasetat ekstraktı göstermiştir.

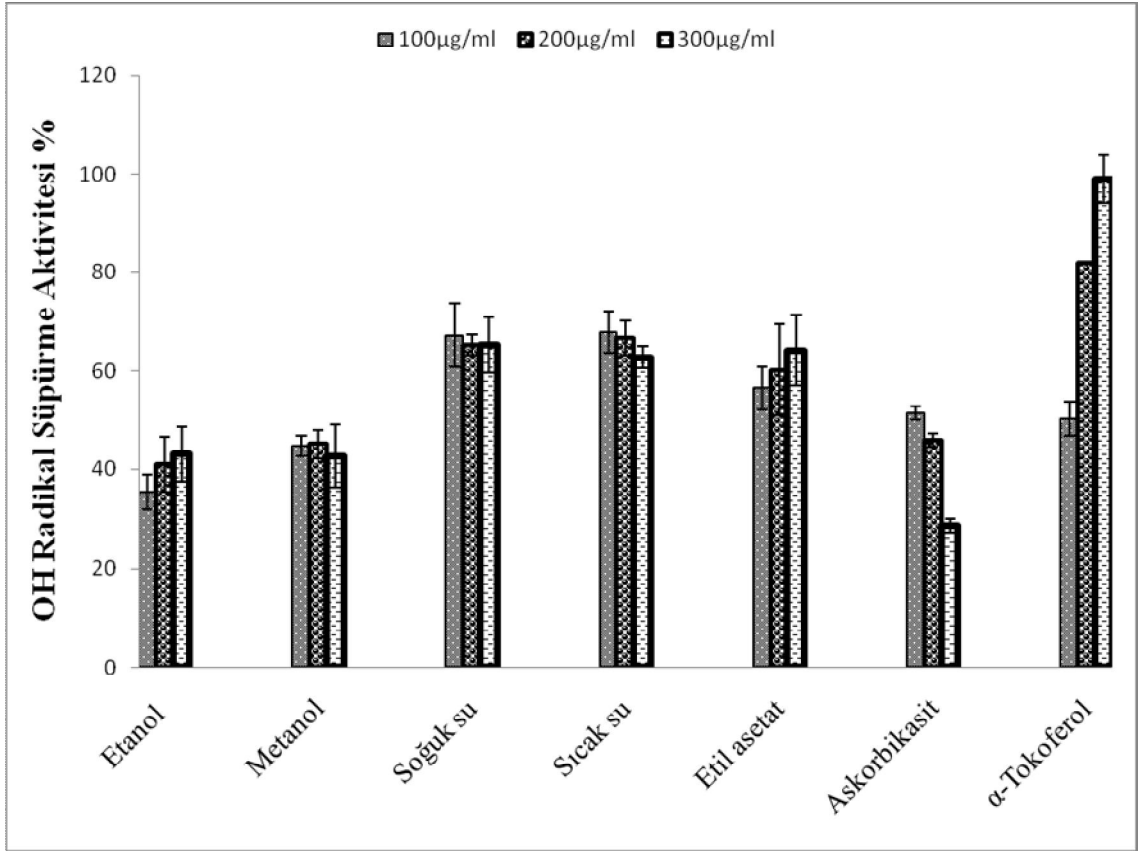
#### 4.3.ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Tayini Sonuçları



Şekil 4.3. Trolox, BHT, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200 ve 300 µg/ml’de ABTS radikal süpürme gücü karşılaştırmalı grafiği. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte en yüksek aktivite 300µg/ml’ de; % 89.98 ile troloks standardı, ekstrakt örneklerinde ise % en yüksek aktivite 300µg/ml’ de; % 88.57 ile soğuk su ekstraktı sonra sırasıyla metanol, etilasetat, sıcak su ve ensonda ise; etanol ekstraktı yer almaktadır. Bu sonuç diğer deney sonuçlarıyla birebir paralel çıkmamıştır.

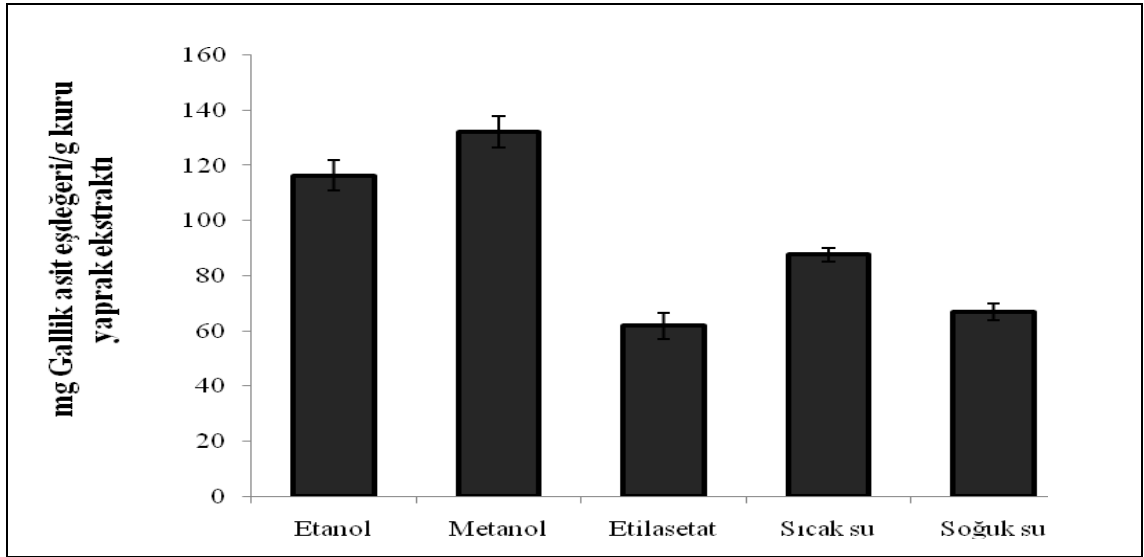
#### 4.4. OH<sup>•</sup> Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Sonuçları



Şekil 4.4. α-Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 100, 200, 300 µg/ml’de OH radikal süpürme aktivitesi antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiğidir. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte görüldüğü gibi en yüksek aktiviteyi standart olan α-tokoferol 100 µg/ml de; % 50.27, 200 µg/ml de; % 81.98 ve 300 µg/ml de; % 114.17 lik bir aktivite gösterirken ekstrakt örneklerinde ise en yüksek aktiviteyi sıcak su ekstraktı 100 µg/ml de; % 62.84, 200 µg/ml de; % 66.75 ve 300 µg/ml de; % 67.94 lük bir aktivite göstermiştir.

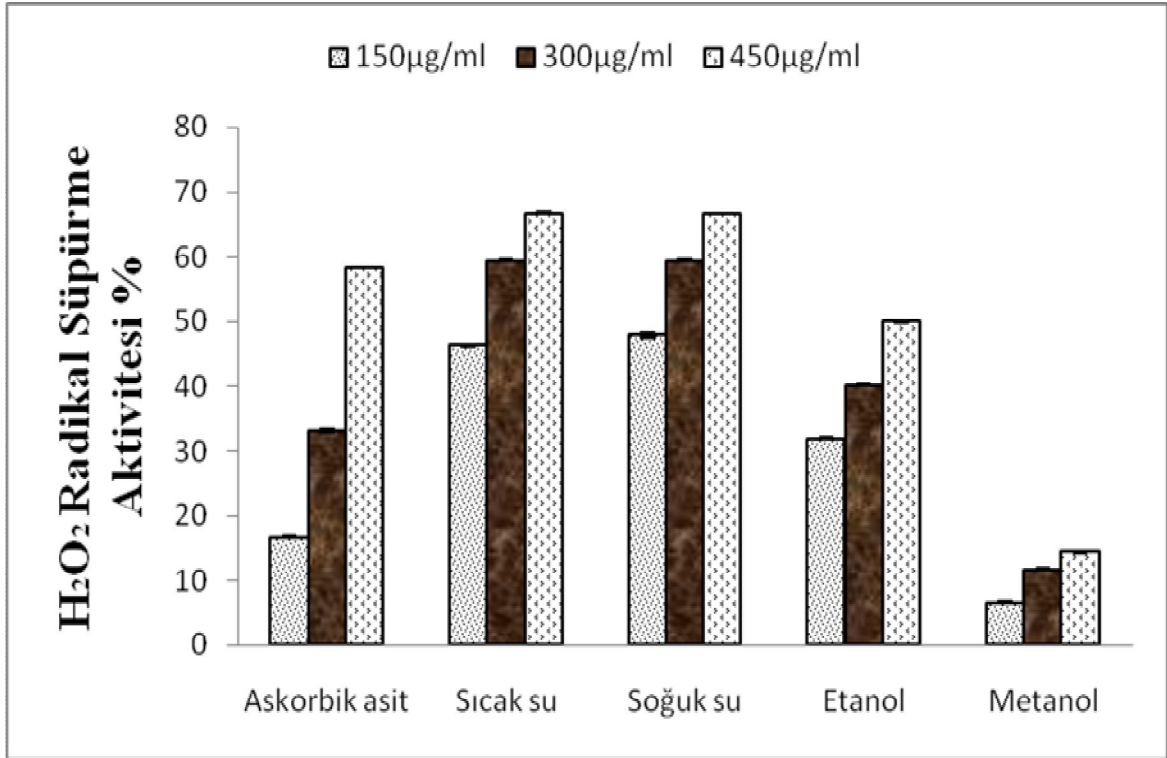
#### 4.5. Toplam Fenolik Bileşik Tayini Sonuçları



Şekil 4.5. Kiraz yaprağının etanol ekstaktı, metanol ekstaktı, etilasetat ekstaktı, sıcak su ekstaktı, soğuk su ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin miktarının gallik asite göre karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte en yüksek fenol içeriği 132,1696 mg GAE/(g kuru yaprak ekstaktı) ile metanol ekstaktı, 116,4334 mg GAE/(g kuru yaprak ekstaktı) ile etanol ekstaktı, 87,63482 mg GAE/(g kuru yaprak ekstaktı) ile sıcak su ekstaktı, 66,88 mg GAE/(g kuru yaprak ekstaktı) ile soğuk su ekstaktı ve en sonda 61,91222 mg GAE/(g kuru yaprak ekstaktı) ile etilasetat ekstaktı yer almaktadır.

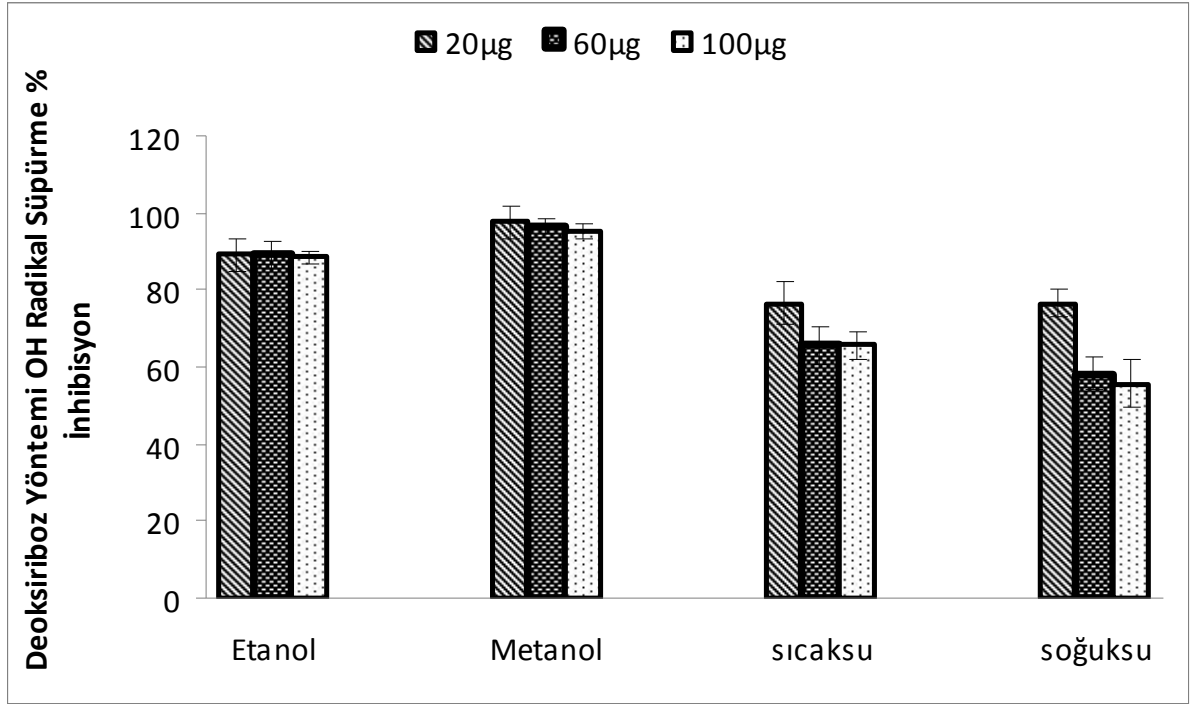
#### 4.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Süpürme Kapasitesi Tayini Sonuçları



Şekil 4.6. Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, etilasetat ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarının askorbikasite karşı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümü karşılaştırmalı grafiği. Her veri üç bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Grafikte sıcak su ekstraktının 150 µg/ml de; % 46.37, 300 µg/ml de; % 59.42, ve 450 µg/ml de; % 66.66 lık bir aktivite ile askorbikasitten ( 150 µg/ml de; % 16.66, 300 µg/ml de; % 33.3 ve 450 µg/ml de; % 58.33 ) daha yüksek aktivite gösterdiği görülüyor.

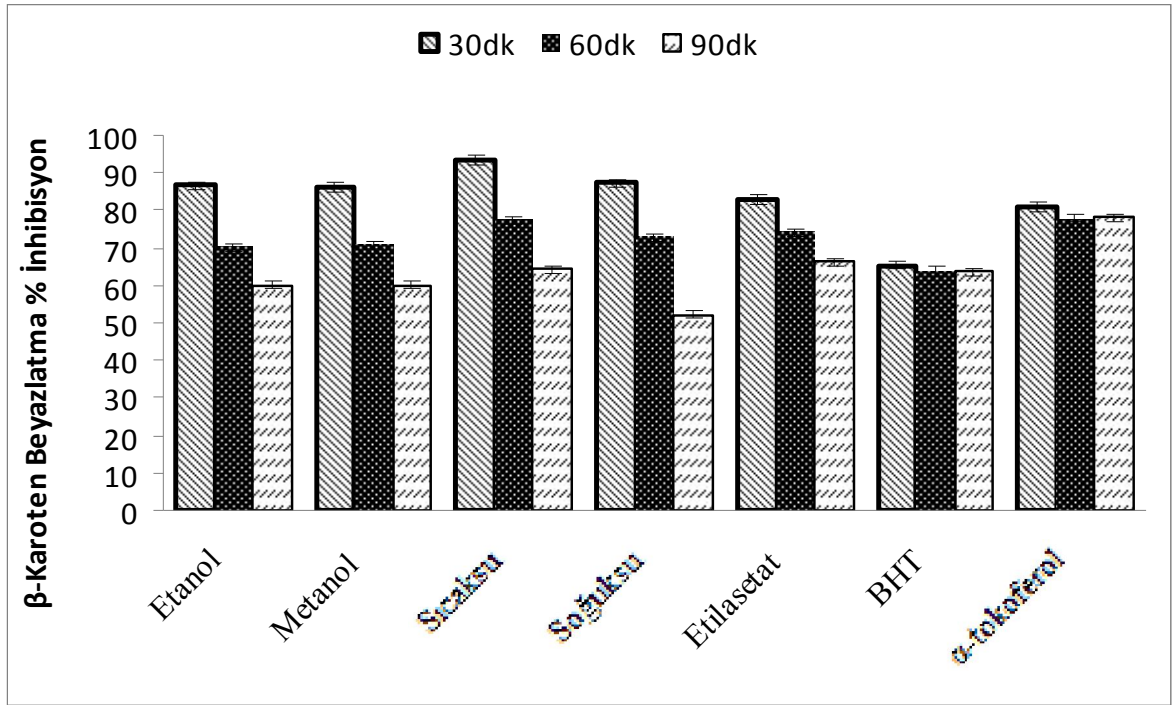
#### 4.7. Deoksiriboz Yöntemi Sonuçları



Şekil 4.8. Kiraz yaprağının etanol ekstraktı, metanol ekstraktı, sıcak su ekstraktı, soğuk su ekstraktlarının deoksiriboz yöntemi ile OH<sup>·</sup> radikal temizleme antioksidan aktivite ölçümü karşılaştırmalı grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

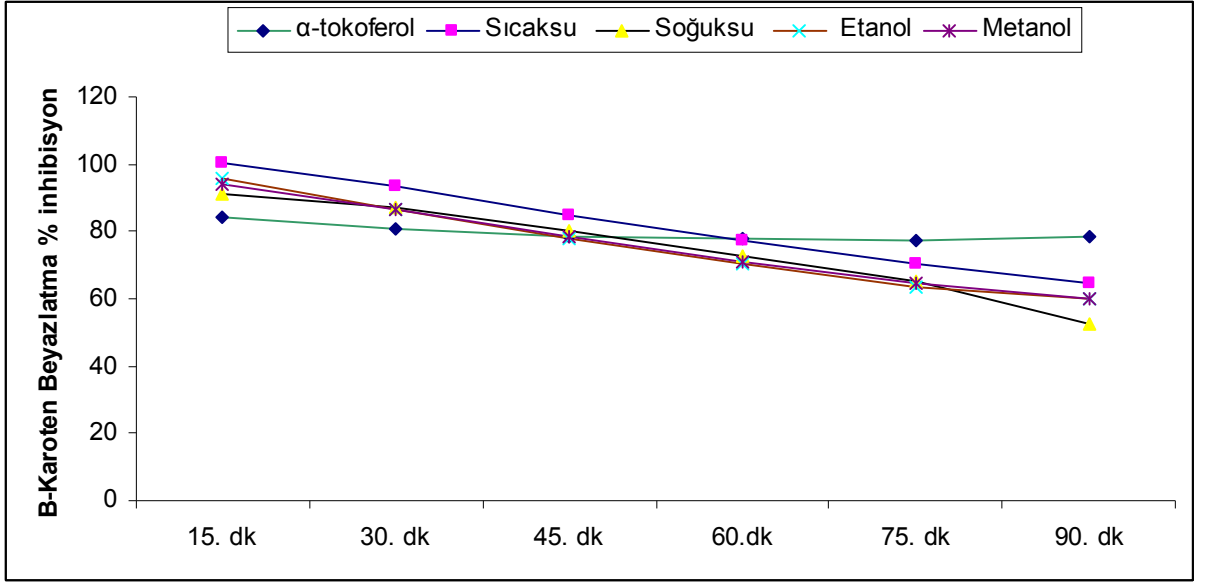
Grafikte ekstraktların konsantrasyonunun artması ile inhibisyonun azaldığını ve en yüksek inhibisyonu etanol ve metanol ekstraktlarının yaptığını görüyoruz. Bu sonuç 4.5’ de yapılan toplam fenolik bileşik tayini sonuçları ile ve 4.10 ‘da yapılan DNA ‘da oksidatif hasar oluşturma ve bitki ekstraktlarının DNA hasarını önleyici özelliğinin gözlenmesi sonuçları ile paralel çıkmıştır.

#### 4.8. $\beta$ -Karoten Beyazlatma Yöntemi Sonuçları



Şekil 4.9. BHT,  $\alpha$ -Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Etilasetat ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 30-60-90 dk aralıklarında  $\beta$ -karoten beyazlatma % inhibisyonu antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılmalı sütun grafiği

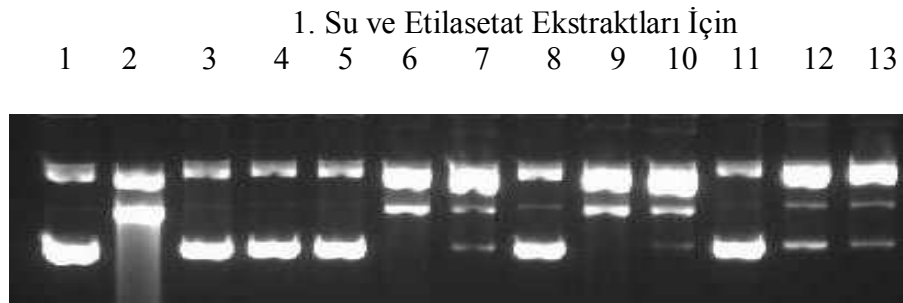
Grafikte en yüksek aktiviteye sıcak su ekstraktının sahip olduğu, bütün ekstraktların birbirine yakın değerde aktivite gösterdiği, ekstrakt örneklerini standartlardan daha yüksek değerde aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.10. α-Tokoferol, Etanol ekstraktı, Metanol ekstraktı, Sıcak su ekstraktı, Soğuk su ekstraktının 15-90 dk aralıklarında β-karoten beyazlatma % inhibisyonu antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılmalı çizgi grafiği

Grafikte en yüksek aktiviteye sıcak su ekstraktının sahip olduğu, bütün ekstraktların birbirine yakın değerde aktivite gösterdiği görülmektedir.

#### 4.9. DNA 'da Oksidatif Hasar Oluşturma ve Bitki Ekstraktlarının Koruyucu Özelliğinin Gözlenmesi Sonuçları



Şekil 4.11. Su ve Etilasetat ekstraktları için jel görüntüsü

1.DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

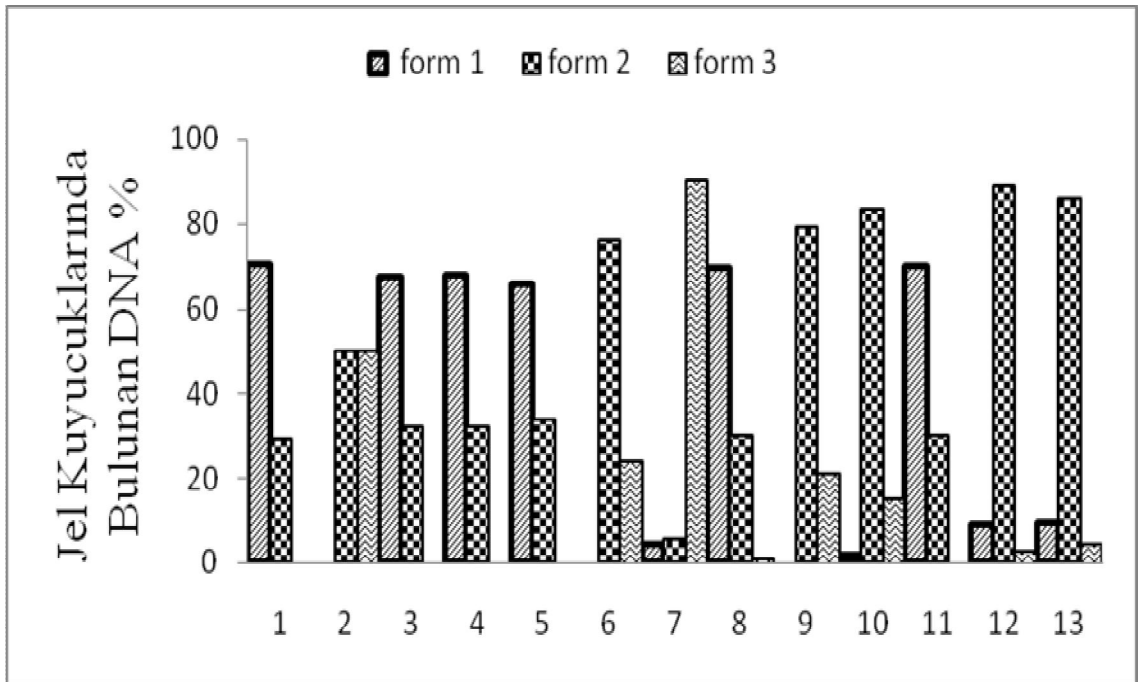
3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
5. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
6. DNA + Sıcak su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
7. DNA + Sıcak su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
8. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
9. DNA + Soğuk su ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
10. DNA + Soğuk su ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
11. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + UV
12. DNA + Etilasetat ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV
13. DNA + Etilasetat ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

Form 1: Süper kıvrımlı çembersel DNA

Form 2: Tek zincir kırığı içeren çembersel DNA

Form 3: İki zincir kırığı içeren çembersel DNA



Şekil 4.12. DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etilasetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları grafiği

Çizelge 4.1. DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etilasetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları

	Supercoiled form1 (en öndekiler)	Open circular form1 (en öndekiler))	Linear form1 (en arkadakiler)
1	70,68	29,04	0,28
2	-	49,83	50,17
3	67,36	32,16	0,48
4	67,80	31,85	0,35
5	65,82	33,81	0,37
6	-	76,14	23,86
7	4,20	5,66	90,14
8	69,46	29,74	0,74
9	-	79,07	20,93
10	1,89	83,19	14,91
11	69,95	29,74	0,31
12	8,82	88,80	2,39
13	9,57	86,06	4,37

## 2. Etanol Metanol Ekstraktları

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Şekil 4.13. Etanol Metanol ekstraktları için jel görüntüsü

1..DNA

2.DNA +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

3.DNA + UV

4. DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

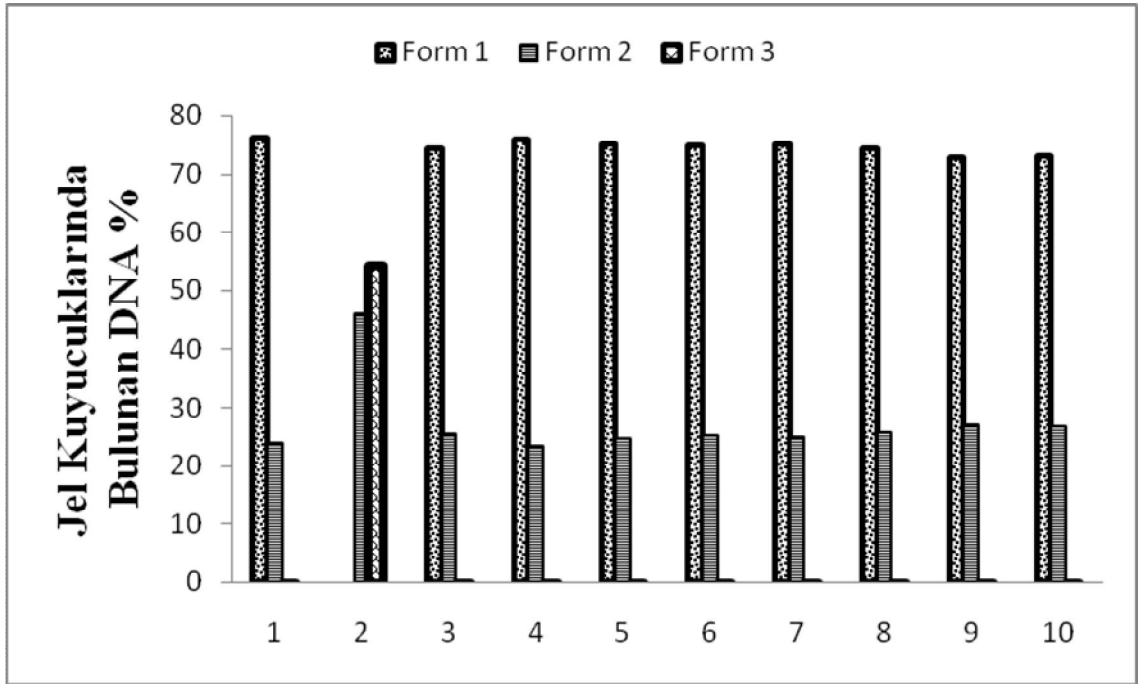
6. DNA + Etanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

7. DNA + Etanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

8. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + UV

9. DNA + Metanol ekstraktı (200 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV

10. DNA + Metanol ekstraktı (400 µg/ml ) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV



Şekil 4.14. DNA 'da oksidatif hasar oluşturma ve etanol ve metanol ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları grafiği

Çizelge 4.2. DNA 'da oksidatif hasar oluşturma etanol ve metanol ekstraktlarının koruyucu özelliğinin gözlenmesi sonuçları

	Supercoiled form1 (en öndekiler)	Open circular form1 (en öndekiler)	Linear form1 (en öndekiler)
1	76,04	23,87	0,07
2	-	45,97	54,03
3	74,40	25,50	0,10
4	75,87	23,36	0,27
5	75,16	24,56	0,28
6	74,84	25,00	0,16
7	75,15	24,82	0,04
8	74,18	25,74	0,08
9	72,77	27,03	0,20
10	73,13	26,74	0,13

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Anadoluda özellikle Malatya ve çevresinde bol miktarda yetiştirilen bir meyve olan kirazın ekonomik yararlılığını ve ürün çeşitliliğini arttırmanın yollarından biri de, kiraz yan ürünlerini daha verimli olarak değerlendirmektir. Bu bakımdan kiraz yaprağının çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla yapılacak çalışmalar bölgemizin kalkınmasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmayla, kiraz yaprağının farklı ekstraktlarından elde edilen antioksidanların radikal süpürme aktivitesinin incelenmesine ve bunların oksidatif DNA hasarı üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Örneklerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin eldesinde ve buna bağlı olarak maksimum antioksidan aktivitesine ulaşılmasında ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözen sisteminin önemi açıkça görülmüştür. Buna göre, farklı çözen sistemleri ile ekstraksiyon denemesi için elde edilen sonuçlarda, önemli düzeylerde farklılıklar saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, çalışılan bitkileri ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarındaki farklılıkların, gösterdikleri antioksidan özelliklerini etkilediği açıkça görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada toplam fenolik miktarına bakıldı standart olarak gallik asit kullanıldı. Toplam fenolik madde kiraz yaprağı etanol, metanol, etil asetat, sıcak su ve soğuk su ekstraktlarında sırasıyla 116.43, 132.17, 61.91, 87.63 ve 66.88 mili eşdeğergram(meg) gallik asit/g kuru yaprak olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar yapılan diğer antioksidan aktivitesi çalışmaları ile çoğunlukla paralel çıktı [117]. Buda gösteriyor ki; ekstraktların toplam fenolik miktarının yüksek olması antioksidan aktivitesini artırabilir fakat bazı çalışmalarımızla paralel olmayan sonuçlarda elde edildi. Örneğin: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Süpürme aktivitesi ve OH Radikal Süpürme aktivitesi deneylerinde en yüksek aktiviteye sıcak su, sonra soğuk su, sonra etanol ve en son metanol ekstraktlarının sahip olması toplam fenolik miktarı ile paralel bir sonuç değildi. Böylece; yüksek fenolik miktarına sahip olmanın, tüm antioksidan aktivitesi çalışmalarında yüksek sonuç vermediği açıkça görülmüştür. Böylelikle tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında karar vermenin doğru bir yaklaşım olmadığı anlaşılmaktadır.

Yaptığımız çalışmalarda ABTS ve DPPH radikal süpürme aktivitesine bakıldı. Aynı sonuca giden bu iki aktivitenin ikisinin de ölçülmesinin nedeni sonuçların paralellliğini karşılaştırmaktı. Gerçekten de iki sonuç ta birbiri ile paralel çıktı. Ayrıca

bu sonuçlar yapılan diğer antioksidan aktivitesi çalışmaları ile çoğunlukla paralel çıktı [100, 113]. Yapılan deneylerde konsantrasyonun artması ile radikal süpürme aktivitesinin arttığı görülmüştür. En yüksek aktiviteyi standartlardan trolox 450 µg/ml'de % 96.16, sonra α-tokoferol 450 µg/ml 'de % 81.92, ve sora BHT 450 µg/ml 'de % 74 lik bir aktivite gösterirken, ekstraktlardan ise en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı; 450 µg/ml 'de % 87.80, sıcak su ekstraktı; 450 µg/ml 'de % 80.95, sonra etanol ekstraktı; 450 µg/ml 'de % 54.24, soğuk su ekstraktı; 450 µg/ml 'de % 33.104, sonra etilasetat ekstraktı; 450 µg/ml 'de % 22.66 lık bir aktivite göstermiştir. Bu sonuç toplam fenolik miktarı ve deksiriboz yöntemi ile doğru orantılı olarak çıkmıştır.

Yaptığımız çalışmalarda indirgeme gücü aktivitesine bakılmış standart olarak en yüksek aktiviteyi BHT 50 µg/ml'de; 200.5 abs, 150 µg/ml'de; 312.5 abs, 250 µg/ml'de; 383.5 abs lık bir aktivite gösterirken ekstrakt örneklerinde ise en yüksek aktiviteyi sırasıyla metanol ekstraktı 50 µg/ml'de; 110 abs, 150 µg/ml'de; 121 abs, 250 µg/ml'de; 133 abs, sonra etanol ekstraktı; 50 µg/ml'de; 101.5 abs, 150 µg/ml'de; 109.5 abs, 250 µg/ml'de; 129 abs, sıcak su ekstraktı; 50 µg/ml'de; 101 abs, 150 µg/ml'de; 112 abs, 250 µg/ml'de; 129 abs, soğuksu ekstraktı; 50 µg/ml'de; 98 abs, 150 µg/ml'de; 107.5 abs, 250 µg/ml'de; 117 abs, ve etilasetat ekstraktı; 50 µg/ml'de; 91.5 abs, 150 µg/ml'de; 100 abs, 250 µg/ml'de; 108 abs' lık bir aktivite göstermiştir. Bu sonuçta toplam fenolik miktarı ve deksiriboz yöntemi ile doğru orantılı bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmalarda OH radikal süpürme gücü aktivitesine bakıldı. Çünkü: Hidroksil radikalleri hücre membranları ve diğer biomoleküller için çok zararlı bir serbest radikaldir. Hidroksil radikallerini süpürme gücü, hücreleri oksidatif hasardan korumada önemlidir. Deneyde en yüksek aktiviteyi standart olarak α-tokoferol 100 µg/ml de; % 50.27, 200 µg/ml de; % 81.98 ve 300 µg/ml de; % 114.17 lik bir aktivite gösterirken örnek ekstraktlarında ise en yüksek aktiviteyi sıcak su ekstraktı 100 µg/ml de; % 62.84, 200 µg/ml de; % 66.75 ve 300 µg/ml de; % 67.94 lük bir aktivite göstermiştir. Bu sonuç toplam fenolik miktarı ve deksiriboz yöntemi ile birebir uyuşmamıştır.

Yaptığımız çalışmalarda β-karoten beyazlatma yöntemi ile antioksidan aktiviteye bakıldı. Sürenin artması ile % inhibisyonun azaldığı görüldü. En yüksek aktivite sıcak su ekstraktında gözlenmekle beraber bütün ekstraktlarda yaklaşık olarak aynı aktivite bulundu (Örneğin; 60. Dakikada etanol ekstraktı: % 70.24, metanol

ekstraktı: %70.75,  $\alpha$ -tokoferol: % 77.80, sıcak su ekstraktı: % 77.37, etilasetat ekstraktı: % 74.02, soğuk su ekstraktı: % 72.71 inhibisyon gözlemlendi).

Yaptığımız çalışmalarda hidroksil radikal yakalama aktivitesinin diğer bir ölçümü deoksiriboz metoduyla yapıldı. Hidroksil yakalama aktivitesi yüksek olan ürünler, – OH grubunu nötralize edip hidrojen atomuna dönüştürerek inaktif hale getirdikleri için önemlidir. Bu deney yapılan diğer bitki çalışmaları ile paralel çıktı [102, 113]. Yapılan deneyde ekstraktların konsantrasyonunun artması ile inhibisyonun azaldı ve en yüksek inhibisyonu etanol ve metanol ekstraktlarının yaptığı görüldü. Bu sonuç 4.5’ de yapılan toplam fenolik bileşik tayini sonuçları ile ve 4.10 ‘da yapılan DNA ‘da oksidatif hasar oluşturma ve bitki ekstraktlarının DNA hasarını önleyici özelliğinin gözlenmesi sonuçları, 4.2. ve 4.3. de yapılan DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi sonuçları ile paralel çıkması deneyin doğru yapıldığının kanıtıdır. Hem bu deney 4.10 ‘da yapılan DNA ‘da oksidatif hasar oluşturma ve bitki ekstraktlarının DNA hasarını önleyici özelliğinin gözlenmesi deneyi için bize yol gösterici bir ön deneme oldu. Çünkü: Yüksek oranda reaktif hidroksil, DNA’ da oksidatif zararlara neden olmakta ve bu hasar deoksiriboz şekeri üzerinde gerçekleşmektedir.

Ve son olarak yaptığımız DNA ‘da oksidatif hasar oluşturma ve bitki ekstraktlarının DNA hasarını önleyici özelliğinin gözlenmesi deneyi yukarıda bahsedildiği gibi deoksiriboz yöntemiyle yapılan deneyle paralellik göstermesi doğru yapıldığının kanıtıdır. Deneyde en yüksek koruyucu aktiviteye 400  $\mu$ g/ml de % 99.82’lik bir koruma aktivitesiyle metanol ekstraktı, sonra 400  $\mu$ g/ml de % 97.17’lik bir koruma aktivitesiyle etanol ekstraktı olarak belirlendi. Etilasetat ve su ekstraktlarında koruyucu aktivite çok düşük olarak belirlendi. Konsantrasyonun artması ile koruyucu aktivitenin arttığı gözlemlendi. (Belirli bir konsantrasyondan sonra koruyucu aktivitenin değişmediği daha önce yapılan ön denemelerde belirlenmişti). Bu sonuç ada çayı ve nane üzerinde yapılan diğer çalışmalarla paralel çıktı [115, 116].

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulardan aşağıdaki sonuçlar çıkartılmıştır;

- Örneklerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin eldesinde ve buna bağlı olarak maksimum antioksidan aktivitesine ulaşılmasında ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözgen sisteminin önemi açıkça görülmüştür.

- Yüksek fenolik miktarına sahip olmanın, tüm antioksidan aktivitesi çalışmalarında yüksek sonuç vermediği açıkça görülmüştür. Böylelikle tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında karar vermenin doğru bir yaklaşım olmadığı ve antioksidan aktivite belirlerken birçok parametre ile bakmanın kesinlikle gerekli olduğu anlaşılmıştır.
- Fenolik bileşenlerin metanol, etanol ve su gibi polaritesi yüksek çözünenlerde daha çok çözünebileceği ve daha yüksek antioksidan aktivite gösterebileceği kanısına ulaşılmıştır.
- Kiraz yaprağını yemek olarak tüketen Anadolu halkının bu yemeğin lezzeti yanında, yüksek değerlerde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve buna bağlı olarak DNA hasarını önleyebileceğini ve böylece oksidatif DNA hasarının neden olduğu hastalıkları önleyebileceğini in vitro koşullarda da olsa öğrenmiş olduk.

Bu çalışmanın sonuçları ışığında ileride yapılacak çalışmalar için aşağıdaki öneriler sıralanabilir;

- Bu çalışmanın in vivo koşullarda hayvan deneyleriyle desteklenmesi faydalı olacaktır.
- Bu tür çalışmaların her yöreye has olarak tüketilen gıdalara uygulanması, halkımızın bilinçlenmesi ve sağlıklı bir gelecek için organik gıda ürünlerine rağbet etmesi açısından faydalı olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. K. Frenkel, *Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidatif DNA damage. Pharmac. Ther.*, 53: (1992) 127-166.
2. A.R Collins, M. Dusinska, C. Gedik, R. Stetina, *Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? Enviromental Health Perspectives*, 104: (1996) 465-469.
3. K. Randerath, G. Zhou, S. Monk, E. Randerath, *Enhanced levels in neonatal rat liver of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidatif DNA lesion, Carcinogenesis*, 18:7 (1997) 1419-1421.
4. İ. Akkuş, *Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
5. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1999.
6. M. Öztürk, Y. Güzelhan, K. Sayar, U. Tüzün, *Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması, Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11:3 (2001) 155-159.
7. B.M. Dawn, D.M.Allan, M.S. Colleen, *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1996.
8. P. Mecocci, M.C. Polidori, T. Ingegneri, A. Cherubini, F. Chionne, R. Ceccetti, U. Senin, *Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients, Neurology*, 51: (1998) 1014-1017.
9. M. Pflaum, O. Will, B. Epe. *Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. Carcinogenesis* 18: (1997) 2225-2231.
10. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, O.U. Press., London, 1999.
11. M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. Faseb Journal*, 17: (2003) 1195-1214.
12. G. Cao, R.L. Prior, *In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, Free Radical Biology & Medicine*, 27: (1999) 1173-1181.
13. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science*, 2: (1997) 152-159.

14. K. Başer, *Tıbbi Bitkiler ve Baharatların Dünya'da ve Türkiye'deki Ticareti ve Talep Durumu*, **Tarım Orman ve Köyisleri Bakanlığı Dergisi**, 53: (1990) 18-21.
15. T. Baytop, *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul Üniv. Yay. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 240-376, 1984.
16. S. Süzen, , *Antioxidant Activities of Synthetic Indole Derivatives and Possible Activity Mechanisms*, Khan, Topics in Heterocyclic Chemistry, Bioactive Heterocycles, 2007.
17. S. Süzen, *Recent developments of melatonin related antioxidant compounds*, **Com Chem High T Synt**, 9(6): (2006) 409-419.
18. C. Kaur, H.C. Kapoor, (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – themillennium's health. *Inti. J. Food Sci. Tech.*, 36, 703-725.
19. Kaur, C., Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *Inti. J. Food Sci. Tech.*, 36, 703-725.
20. J. Limón-Pacheco, M.E. Gonsebatt / **Mutation Research** 674: (2009) 137–147.
21. B.N Ames, M.K Shigenaga, M.T. Hagen *Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging*, **Proc Natl Acad Sci**, 90: (1993) 7915-22.
22. M.B. Kadiiska, B.C. Gladen, D. Baird, L. Graham, C. Parker, B. Ames, *Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal antiinflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning*, **Free Rad Bio Med** 38: (2005) 711-718.
23. C.R. Wheeler, J. Salzman, N. Elsayed, S. Omaye, D. Korte, *Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity*, **Anal Biochem**, 2: (1990) 184-193.
24. J. Nordberg, E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*, **Free Radic Biol Med.** 31: (2001) 1287–1312.
25. J.M.C. Gutteridge, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*, **Clin Chem**, 41:12 (1995) 1819-28.
26. K.H. Cheeseman, T.F. Slater, *An Introduction to radical biochemistry*, **Br. Med. Bull**; 49: (1993) 481–493.
27. J.M. McCord, *The evolution of free radicals and oxidative stres*, **Am JMed**, 108: (2000) 652–659.
28. M.A. Omar, C. Beedham, I. Alsarra, *Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms*. **Saudi Pharm J**, 12:1 (2004) 1-18.
29. T.F. Slater, *Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury*, **Biochem. J.**, 222: (1984) 1-15.

30. M.J. Davies, *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*, **Biochem Biophys Res Commun.** 305: (2003) 761–70.
31. M. Uysal, *Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar*, **Klinik Gelişim**, 11: (1998) 336–341.
32. B. Halliwell, *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans*, **Free Radic Res.**, 25: (1996) 57–74.
33. K. Randerath, G.D. Zhou, S.A. Monk, E. Randerath, *Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion*, **Carcinogenesis**, 18: (1997) 1419-1421.
34. M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease*, **Faseb J**, 17: (2003) 1195-1214.
35. M.D. Evans, M.S. Cooke, *Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids*, **BioEssays**, 26: (2004) 533-542.
36. D.A. Hughes, *Dietary antioxidants and human immune function*, **Foundation Nutr. Bulletin**, 25: (2000) 35-41.
37. A. Yalçın, *Antioksidanlar*, **Klinik Gelişim**, 11: (1998) 342-346.
38. U. Mercan, *Toksikolojide serbest radikallerin önemi*, **Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 15: (2004) 91-96.
39. Y.H.Chu, C.L. Chang, H.F. Hsu, *Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity*, **J. Sci. Food Agric.**, 80: (2000) 561-566.
40. S.D. Warma, P.S. Devamanoharan, S.M. Morris, **Crit.Rev.Food Sci.Nutr.**, 35: (1995) 111-129.
41. S. Powers, L. Ji, C. Leeuwenburgh, *Exercise Traininginduced Alterations In Skeletal Muscle Antioxidant Capacity*, **Med Sci Sports Exerc.**, 31: (1999) 87-97.
42. İ. Gülçin, *Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes, and investigation of some in vivo properties of nettle (Urtica dioica)*. PhD Thesis, Atatürk University, 2002, 45-48.
43. A. Meisler, M.E. Anderson, *Glutathione*, **Ann. Rev. Biochem.**, (1983) 711-760.
44. R.R. Thieme, E.F.Pai, R.H. Schirmer, G.E. Schulz, **J. Mol. Biol.**, (1981) 763-782.
45. A. Gökçe Gürkök, *Biyolojik Önemi Olan İndol Türevi Bileşiklerin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları Ve Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.

46. A.K. Banarjee, A. Mandal, D. Chanda, S. Chakraborti, *Oxidant, antioxidant and physical exercise*, **Mol Cell Biochem**,; 253: (2003) 307-312.
47. O. Köylüoğlu, M. Tarakçioğlu, *E vitamini ve klinik önemi*, **İbni Sina Tıp Dergisi**, 6: (2001) 66-71.
48. P.M. Abuja, M. Murkovic, W. Pfannhauser, *Antioxidant and prooxidant activities of Elderberry (Sambucus nigra) extract in Low-Density-Lipoprotein oxidation*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: (1998) 4091–4096.
49. G. Blekas, D. Boskou, *Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenil acetic acid and  $\alpha$ -tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil*, **Grasasy Aceites**, 49: (1998) 34–37.
50. H.W. Dawes, J.B. Keene, *Phenolic composition of kiwi fruit juice*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: (1999) 2398–2403.
51. Z.Y. Wang, M.T. Huang, Y.R. Lou, J.G. Xie, K.R. Reuhl, *Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet Newmark*, (1994)
52. L. Wen, R.E. Wrolstad, V.L. Hsu, *Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (Ananas comosus) and sage (Salvia officinalis) by enzyme-assisted ensiling*, **J. of Agr. and Food Chem.**, 47: (1999) 2959-2962.
53. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, *Polyphenols: food sources and bioavailability*, **Am. J. Clin. Nutr.**, 79: (2004) 727-747.
54. A. King, G. Young, *Charecteristics and occurence of phenolic phytochemicals.*, **J.A.D.A.**, 99: (1999) 213-218.
55. L. Bravo, *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance* **Nutrition Reviews**, 56:11 (1998) 317-333.
56. M.A. Soobrattee, V.S. Neergheen, *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism of actions*. **Mut. Res.**, 579: (2005) 200-213.
57. W. Bors, C. Michel, K. Stettmaier, *Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols*, **Methods in Enzymology**, 335: (2001) 166-180.
58. A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, *Dietary polyphenols and prevention of diseases*, **Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, 45: (2005) 287-306.
59. K.E. Heim, A.R. Taghaferro, D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13: (2002) 572-584.

60. R.L. Prior, *Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage*. **Am. J. Clin. Nutr.**, 78: (2003) 570-578.
61. M. Kaplan, T. Hayek, *Pomogranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis*, **J. Nutr.**, 131: (2001) 2082-2089.
62. J.M. Geleijnse, L.J. Launer, *Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident of myocardial infarction the rotterdam study*, **Am. J. Clin. Nutr.**, 75: (2002) 880-886.
63. I.S. Young, J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*, **J Clin. Pathol.**, 54: (2001) 176-186.
64. J.P. Kehrer, J.V. Smith, *Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. Natural Antioxidants in Health and Disease*, Academic Press Inc., USA, 25-55, 1994.
65. C.S. Yang, J.M. Landau, M.T. Huang, H.L. Newmark, *Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*, **Ann. Rev. Nutr.**, 21: (2001) 381-406.
66. H. Mukhtar, N. Ahmad, *Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health*, **Am. J. Clin. Nutr.**, 71: (2000), 1698-1720.
67. K.B. Beckman, B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*, **Physiological Reviews**, 78:2 (1998) 547-581.
68. M.R. Olthof, P.C. Hollman, P. Zock, M.B. Katan, *Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocystiene concentration in humans*, **J. Clin. Nutr.**, 73: (2001) 532-538.
69. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, *Polyphenols: food sources and bioavailability*, **Am. J. Clin. Nutr.**, 79: (2004) 727-747.
70. S.E. Rasmussen, V.M. Breinholt, *Non-nutritive bioactive food constituents of plants: Bioavailability of flavonoids*, **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, 73: (2003) 101-111.
71. P.C.H. Hollman, M.P.V. Trijp, *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. **FEBS Letters**, 418: (1997) 152-156.
72. D.O. Kim, S.W. Jeong, C.Y. Lee, *Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums*, **Food Chemistry**, 81: (2003) 321-326.
73. R.J. Williams, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans, *Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?*, **Free Radical Biology and Medicine**, 36: (2004) 838-849.

74. J.M.C. Gutteridge, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*, **Clin Chem**, 41:12 (1995) 1819-28.
75. A. Brevik, S.E. Rasmussen, C.A. Drevon, L.F. Anderson, *Urinary excretion of flavonoids reflects even small changes in the dietary intake of fruits and vegetables*. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 13:5: (2004) 843-849.
76. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, *Harper's Biochemistry*, 25 th ed. Appleton & Lange, 2000.
77. P.C. Champe, R.A. Harvey, *Biochemistry Lippincott's Illustrated Reviews*, in J.B. Lippincott Company, 1998, Philadelphia.
78. O. Neyzi, E. Türkan, *Pediatric I.*, 136-138, İstanbul, 2002.
79. B. Halliwell, O. Aruoma, *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*, **FEBS Letters**, 281: (1991) 9-19.
80. T.H. Zastawny, S.A. Altman, L. Randers-Eichhom, R. Madurawe, J.A. Lumpkin, M. Dizdaroglu, G. Rao, *DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions*, **Free Rad Biol Med.**, 18: (1995) 1013-1022.
81. J.R. Milligan, J.F. Ward, *Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals*, **Radiat Res.**, 137: (1994) 295-299.
82. J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. Ravanat, *Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features*, **Mutat Res**, 531: (2003) 5-23.
83. Y. Li, M.A. Trush, *Reactive O<sub>2</sub>-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism*. **Cancer Res**, 54: (1994) 189-195.
84. M.H. Yang, K.M. Schaich, *Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes*, **Free Radic Biol Med**, 20: (1996) 225-236.
85. M. Dizdaroglu, *Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin*. **Mutat Res.**, 75: (1992) 331-342.
86. P.G. Winyard, D. Perrett, D.R. Blake, G. Harris, J.K. Chipman, *Measurement of DNA oxidation products*, **Anal Proceedings**, 27: (1990) 224-227.
87. G.M. Rao, A. Raju, *Lipid peroxidation in brain tumors*, **Clin Chim Acta**, 302: (2000) 205-11.
88. D.F. Lowy, R. Base, A.A. Simo, *Evidence for a high free radical state in low-grade astrocytomas*, **Neurosurgery**, 41: (1997) 46-50

89. J.D. Boer, J. Hoeijmakers, *Nucleotide excision repair and human syndromes*, **Carcinogenesis**, 21: (2000) 453-460.
90. A.S. Balajee, V.A. Bohr, *Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair*, **Gene**, 250: (2000) 15-30.
91. A.O. Çavdar, *Gelismekte olan ülkelerde çocukluk kanserleri*, Araştırma Monografisi Tübitak, 1997.
92. F. Hıncal, N. Başaran, *Selenium status in Turkey. Int. j. Toxicology*, **Occupational and Environmental Health**, 2: (1991) 114-115.
93. T. Hirohata, *Cancer prevention by micronutrients in humans*, **Vitamins (Kyoto)**, 73: (1973) 127-134.
94. V. Sgarbieri, *The role of dietary energy and of macro componenets of foods in modulating carcinogenetics*, **Ciencia e Cultura**, 51: (1999) 104-121.
95. S.M. Krebs-Smith, *Progress in improving to reduce cancer risk*, **Cancer**, 83: (1999) 425-32.
96. S. Chan, B. Person, S. Subramanian, *The role of copper, selenium,zinc and molybdenium in Nutrition and Health. Clin Lab. Med*, 8: (1998) 673-85.
97. K.N. Prasad, W.C. Cole, B.P. Kumar, K.C.Tasad, *Scientific rationale for ysing high-dose multiple micro nutrients as an adjunct to standard and experimental cancer theTapias*, **J Am Coll Nutrit.**, 20: (2001) 4505-4635.
98. T. Doerr, S.C. Marks, A.S. Prasad, *Effects of zinc and nutritional status on clinical outcomes in head and neck cancer*, **Nutrition**, 14: (1998) 989-995.
99. K. Saito, *Kinetics of trace elemenis in cancer patients in Trace Elements in Clinical Medicine*, ed. E.H. Tomita., Springer - Verlag ,Tokyo. 141-149, 1989.
100. K. Kiningham, E. Kasarskis, *Antioxidant Function of metallothioneins*, **J. Trace Elem. Exp. Medicine**, 11: (1998) 219-226.
101. S. Mathew, T.E. Abraham, *In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extracts assayed by different methodologies*, **Food and Chemical Toxicology**, 44: (2006) 198-206.
102. J.Y. Hwang, *Antioxidative Activity of Roasted and Defatted Peanut Kernels*, **Food Research International**, 34:7 (2001) 639-647.
103. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C.R. Evans, *Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*, **Free Radical Biology and Medicine**, 26: (1999), 1231–1237.

104. G.C. Yen, H. Chien, *Effects of Alkaline and Heat Treatment on Antioxidative Activity and Total Phenolics of Extracts from Hsian-Tsao (Mesona Procumbens Hemsl.)*, Food Research International, 33: (2000) 487-492.
105. N. Smirnoff, Q.J. Cumbes, *Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes*, **Phytochemistry**, 28: (1989) 1057–1060.
106. Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays, Reviews, Journal of Agricultural Food Chemistry, 53, 1841-1856.
107. G.R. Zhao, Z.J. Xiang, T.X. Ye, Y.J. Yuan, *Antioksidant activities of salvia miltiorrhiza and panax notoginseng*, **Food Chem.**, 99: (2006) 767-774.
108. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *the deoxyribose method: A simple test tube assay for determination rate constants for reaction hydroxyl radicals*, **Anal Biochem**, 165: (1987) 215-219.
109. K. Fukuhara, N. Miyata, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 8:1998), 3187-3192.
110. A. Russo, A. İzzo, F. Borrelli, M. Renis, **Phytotherapy Research**, 17:(2003), , 870-875.
111. G. Attaguile, A. Russo, F. Campisi, F. Savoca, R. Accuaviva, A. Ragusa, *Vanella Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from cistus incanus L. and Cistus monspeliensis L.* **Cell Biol Toxicol** 16: (2000)83-90.
112. TCP. Dinis, VMC. Madeira, LM. Almeida, *Action of fenolic derivatives ( acetaminophen, salicylate, and 5-amino salisylate ) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers.* **Arch Biochem Biophys** 315:(1994); 161-169.
113. S. Caillet, H. Yu, , S. Lessard, , G. Lamoureux, , D. Ajdukovic, and M. Lacroix, , *Fenton reaction applied for screening natural antioxidants*, **Food Chemistry**, 17:(2006)53-17
114. R. Özçağırın, , A. Ünal, , E. Özeker, , M. İsfendiyaroğlu, , İlman İklim Meyve Türleri, Sert Çekirdekli Meyveler, Cilt 1, Ege Üniv. Basımevi, Bornova , 2003
115. N. Brahma Singh, B.R. Singh , R.L. Singh , D. Prakash , R. Dhakarey , G. Upadhyay , H.B. Singh, *Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of Moringa oleifera* **Food and Chemical Toxicology** 47:(2009) 1109–1116.

116. E. Sevil, Ç. Bircan, K. Göksel, K. Murat, *DNA damage protecting activity and invitro antioxidant potential of the methanol extract of Cyclotricium niveum*. **Pharmaceutical Biology**,;47:(2009),(3)219-229.
117. Ara Kirakosyan, E.M. Seymour, E. Daniel Urcuyo Llanes, B. Peter Kaufman, F. Steven Bolling, *Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products*. **Food Chemistry** 115: (2009) 20–25.
118. G. Durmaz, M. Çam and T. Kutlu, *Antioxidant Activity of Some Edible Leaves*. 2nd International Congress on Food and Nutrition, 24-26 October 2007, ISTANBUL.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Kasım TAKIM

**Doğum Tarihi:** 20. 03. 1987

**Doğum Yeri:** Erzurum

**Adresi:**

İnönü Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü

İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü

44280, MALATYA

E-posta: kasmtakm515@gmail.com

### **Eğitim Durumu:**

2003-2004 Bursa Erkek Lisesi Mezunu

2004-2008 İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Lisans Mezunu

2008-2010: İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Yüksek Lisans Bitirme aşamasında

### **Çalışmaları:**

Oksidatif DNA Hasarı ve Bitkisel Antioksidanların Koruyucu Etkisi







