T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

In vitro OKSİDATİF HASAR OLUŞTURULMUŞ DNA ÜZERİNE NAR KABUĞU, TETRA VE ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dua DANJOLLİ-HASHANİ

DOKTORA TEZİ

KİMYA

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

EDİRNE – 2022

DUA DANJOLLİ-HASHANİ'in hazırladığı "*In vitro* OKSİDATİF HASAR OLUŞTURULMUŞ DNA ÜZERİNE NAR KABUĞU, TETRA VE ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL	……
Prof. Dr. Hülya YAĞAR	……
Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR	……
Doç. Dr. Filiz SANAL	……
Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV	……

Tez Savunma Tarihi: 24/10/2022

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……
Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

24/10/2022
Dua Danjolli-Hashani
İmza

Doktora Tezi

In vitro Oksidatif Hasar Oluşturulmuş DNA Üzerine Nar Kabuğu, Tetra ve Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının Etkisinin İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya

ÖZET

Çalışmanın amacı besin olarak kullanılmayan nar (Hicaz türü) kabuğu, zeytin yaprağı (Domat ve Gemlik türleri) ve tetra yaprağından (*Cotinus coggygria*) elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerine katkı sağlayan fitobileşenlerce analizlenmesi, bu bitki örneklerinin DNA üzerinde oluşturulan in vitro oksidatif hasar üzerinde koruyucu etkisinin, karaciğer sağlıklı ve kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının incelenmesidir.

Bitkisel kaynaklardan fenolik bileşence zengin ekstrakt elde etmek için farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır. Nar kabuğu, tetra ve zeytin yapraklarının %70'lik etanol çözücüsüyle çalkalamalı su banyosu kullanılarak geleneksel bir metod ile, ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak modern bir metod ile ekstraksiyonları yapıldı. Ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlarda genel olarak ekstrakt verimi, spektrofotometrik yöntem ile yapılan toplam fenolik ve flavonoid madde içeriği ve serbest radikal giderme gücünün daha yüksek olduğu görüldü. DPPH ve ABTS metodlarında tetra yaprağı ve nar kabuğu düşük EC_{50} değerlerine sahip olarak serbest radikalleri gidermede etkili oldular.

AML12 (normal karaciğer) ve Hep3B (karaciğer kanseri) hücre hatları kullanılarak MTT testi uygulandı. Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar hücreler ile 24 saat ve 48 saat muamele edildi. Tetra yaprağı, Hicaz türü nar kabuğu, Gemlik zeytin yaprağı ve Mix (nar kabuğu+tetra yaptağı+Domat türü zeytin yaprağı karışımı) ekstraktlarının AML12 hücrelerinde doza bağımlı koruyucu etki gösterdiler, Domat zeytin yaprağı ekstraktı ise çalışılan yüksek

konsantrasyonlarında canlılıkta azalmaya neden oldu. Hep3B hücrelerinde doza bağımlı sitotoksik etki gözlendi, 24 saatlik inkübasyon sonrasında Domat örneği dışında, başta Tetra yaprağı ve Mix ekstraktı olmak üzere tüm ekstraktlar antiproliferatif etki gösterdiler.

Antioksidanlar özellikle serbest radikallerin oluşumunu ve zararlı etkilerini önleyen ve bunun sonucunda oksidatif hasara karşı DNA ve diğer biyomolekülleri koruyan bileşikler veya bitkisel kaynaklardır. 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin (8-OH-2dG) ve/veya 8-hidroksiguanin (8-OHGua) ölçümü DNA'daki oksidatif hasarın belirtecidir. Çalışmada, buzağı timus DNA'sı Fenton reaksiyonuyla oluşturulan hidroksil radikali ile oksidatif hasara uğratıldı ve oluşan 8-OH-2dG miktarları LC-MS/MS cihazı ile ölçüldü. Nar kabuğu, tetra, Domat ve Gemlik türü zeytin yaprakları ekstraktlarının ve Mix ekstraktının oluşturulan hasarı önleme kapasitesi değerlendirildi. Oksidatif DNA hasarını en yüksek oranda Hicaz türü nar kabuğu, tetra yaprağı ve Mix ekstraktları engelledi.

Gıda olarak tüketilmeyen bitkisel ürünlerin veya tarımsal atık ürünlerin biyoaktif bileşik kaynağı olarak kullanılması ekonomi ve geri kazanım açısından önem arzetmektedir. Çalışmada LC-MS/MS cihazı ile bu tür bitkisel kaynaklardan alınan ekstraktların fenolik bileşenlerinin türü ve miktar tayinleri yapıldı. Hicaz türü nar kabuğunda ana bileşen olarak ellajik asit başta olmak üzere absisik asit, etil gallat, gallik asit; tetra yaprağında en fazla verbaskosit, gallik asit, protokateşik asit, mirisetin, etil gallat ve şiringik asit; zeytin yapraklarında oleuropein başta olmak üzere klorojenik asit, verbaskosit, tirozinol ve rutin bulundu. Bitkilerin ikincil metabolitleri olan bu biyoaktif bileşikler ekstraktların gösterdikleri antioksidan, sitotoksik ve oksidatif DNA hasarını önleme aktivitelerinden sorumlu olabilirler.

Yıl **:** 2022

Sayfa Sayısı **:** 149

Anahtar Kelimeler **:** 8-OH-2'dG, Fenolik madde, LC-MS/MS, MTT testi, Oksidatif DNA hasarı, Radikal giderme

Doctoral Thesis

The Investigation of Effect of Pomegranate Peel, Tetra and Olive Leaf Extracts on DNA Oxidatively Damaged *In vitro*

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

This study aims to investigate the extracts obtained from pomegranate peel (Hicaz gentype), olive leaves (Domat ve Gemlik gentypes) and smoke tree leaf (*Cotinus coggygria*), which are not used as nutrients, by phytocomponents that contribute to their antioxidant activities, and to determine whether these plant samples have protective effect against oxidative DNA damage.

Different extraction techniques are used to obtain phenolic-rich extract from plant sources. Both conventional extraction technique using a shaking water bath and ultrasound-assisted extraction as a modern method were performed with 70% ethanol solvent for extractions of pomegranate peel, smoke tree and olive leaves. It was observed that the extracts obtained from ultrasonic assisted extraction (USE) generally had higher extract yield, free radical scavenging capacity and, total phenolic and flavonoid compounds carried out by spectrophotometric method. In DPPH and ABTS methods, smoke tree leaf and pomegranate peel had low EC_{50} values which indicates the strong free radicals scavenging activities.

MTT assay was applied to the extracts using AML12 (normal liver) and Hep3B (liver cancer) cell lines. Cells were treated with extracts of different concentrations during 24 hours and 48 hours. The extracts of smoke tree leaf, Hicaz type pomegranate peel, Gemlik olive leaf and Mix (pomegranate peel + smoke tree leaf + Domat type olive leaf mixture) showed a dose-dependent protective effect on AML12 cells. Domat olive leaf extract, on the other hand, caused a decrease in viability at the high concentrations studied. A dose-dependent cytotoxic effect was

observed in Hep3B cells, after 24 hours of incubation, all extracts, especially smoke tree leaf and Mix extract, showed antiproliferative effects, except for Domat sample.

Antioxidants are compounds or herbal sources that prevent the formation and harmful effects of free radicals and, as a result, protect DNA and other biomolecules against oxidative stress. Measurement of 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine (8-OH-2dG) and/or 8-hydroxyguanine (8-OHGua) are markers of oxidative damage in DNA. In the study, the hydroxyl radical formed by Fenton reaction damaged calf thymus DNA oxidatively and, the amounts of 8-OH-2dG were measured by LC-MS/MS. The capacity of pomegranate peel, smoke tree leaf, Domat and Gemlik olive leaf extracts and the Mix extract to prevent this damage was evaluated. Hicaz pomegranate peel, smoke tree leaf and Mix extracts prevented oxidative DNA damage at the highest rate.

The use of plant products that are not consumed as food or agricultural waste products as a source of bioactive compounds is important in terms of economic and recovery. The phenolic compounds and quantity determinations of the plants used in the study were made by LC-MS/MS. The Hicaz pomegranate peel contains ellagic acid as major compound, abscisic acid, ethyl gallate, gallic acid. Smoke tree leaf contains the most verbascoside, gallic acid, protocatechic acid, myricetin, ethyl gallate and syringic acid. In olive leaves, mainly oleuropein, chlorogenic acid, verbascoside, tyrosinol and rutin were found. These bioactive compounds, which are secondary metabolites of plants, may be responsible for their antioxidant, cytotoxic and oxidative DNA damage prevention activities.

Year **:** 2022

Number of Pages **:** 149

Keywords **:** 8-OH-2dG, Phenolic compound, LC-MS/MS, MTT test, Oxidative DNA damage, Radical scavenging

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan, bilgi ve deneyimlerini sonsuz sabır göstererek benimle paylaşan başta değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e, Deneylerim sırasında bilimsel birikimleri ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR ve Prof. Dr. Figen ERTAN'a, Eğitimim süresince katkıları olan Prof. Dr. Hakkı M. ÖZCAN'a, deneylerimin önemli bir kısmını gerçekleştirdiğim Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi ekibine, Öğr. Gör. Dr. Saffet ÇELİK ve Öğr. Gör. N. Pelin TÜRKER'e, hayatımın her anında koşulsuz şartsız sevgi ve destekleriyle yanımda olan ve bana güç veren Annem Fitnet DANJOLLİ, Babam İbrahimhaki DANJOLLİ ve Abim Rinor DANJOLLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu sürecin en başından beri hep yanımda olan, sevgisini, ilgisini esirgemeyen sevgili eşim Xhihad HASHANİ'ye sonsuz teşekkürler.

Çalışmamda kullandığım narları ve zeytin yapraklarını temin ettiğimiz Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM-Antalya) ve Bornava Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'ne (İzmir) teşekkür ederim.

Bu tez, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) biriminin TÜBAP-2019/ 159 no'lu projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR … viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... …….xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xv
EKLER DİZİNİ xvii
BÖLÜM 1
GİRİŞ ve AMAÇ 1
BÖLÜM 2
GENEL BİLGİLER 3
2.1. Deoksiribonükleik asit (DNA) 3
2.2. Serbest Radikaller 5
2.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin DNA'ya Etkisi 7
2.4. DNA'nın Oksidatif Hasar Belirteci 13
2.5. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri 19
2.6. DNA Onarımı 21
2.7. Antioksidanlar 25
2.7.1. Fenolik Bileşikler 26
2.8. MTT Testi 30
2.9. Çalışmada Kullanılan Bitkiler 32
2.9.1. Nar…..... 34
2.9.2. Tetra yaprağı 38
2.9.3. Zeytin yaprağı 39
BÖLÜM 3
3. MATERYAL VE METOD 43

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar 43
3.1.1. Kullanılan çözeltiler.....44
3.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması 45
3.3. Örneklerin Antioksidan Aktivitesinin Tayini 46
3.3.1. Toplam fenolik madde tayini 46
3.3.2. Toplam flavonoid tayini 47
3.3.3. DPPH radikali giderme aktivitesi.....48
3.3.4. $ABTS^{+\bullet}$ radikali giderme aktivitesi 50
3.4. Ekstraktların Fenolik Madde Profilinin Analizlenmesi.....50
3.5. Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkinin İncelenmesi…….....51
3.6. DNA'da Oksidatif Hasar Oluşturulması ve 8-OH-2dG Ölçümü.....53
BÖLÜM 4
4. BULGULAR 55
4.1. Ekstrakt Eldesi 55
4.2. Spektrofotometrik Metod ile TPC ve TFC Miktar Tayini.....56
4.2.1. Toplam fenolik madde tayini 56
4.2.2. Toplam flavonoid madde tayini 56
4.3. Antioksidan Aktivite Tayinleri 57
4.3.1. DPPH radikali giderme aktivitesi 57
4.3.2. ABTS radikali giderme aktivitesi 58
4.4. Örneklerin Fenolik Madde Profilinin LC-MS/MS ile Analizlenmesi 61
4.5. Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkinin İncelenmesi (MTT Testi).....74
4.6. DNA Üzerinde Oksidatif Hasar Oluşturulması ve Ekstraktların Koruyucu Gücünün Araştırılması 79
BÖLÜM 5
5. TARTIŞMA.....80
KAYNAKLAR 99
EKLER.....118
ÖZGEÇMİŞ.....131
Tez Öğrencisine Ait Tez ile İlgili Bilimsel Faaliyetler 132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\bullet}OH$	: Hidroksil radikali
$^{1}O_2$	: Singlet oksijen
8-OH-2dG	: 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin
8-OHGua	: 8-hidroksiguanin
A	: Adenin
ABTS	: 2,2'-Azinobis (3-benzotiazolin-6-sülfonik asit)
$ABTS^{+\bullet}$	: ABTS radikali
AML12	: Alfa fare karaciğer hücre hattı
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
C	: Sitozin
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
FBS	: Fetal sığır serumu
FCR	: Folin-Ciocalteau reaktifi
G	: Guanin
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
Hep3B	: İnsan hepatosit karsinoma hücre hattı
MAE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MTT	: 3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
$O_2^{\bullet-}$	: Süperoksit Anyonu
PBS	: Fosfat tamponu
KE	: Kersetin eşdeğeri
$R^{\bullet}$	: Karbon merkezli organik radikaller
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SBE	: Çalkalamalı su banyosu ekstraksiyonu
T	: Timin
TFC	: Toplam flavonoid madde miktarı
TPC	: Toplam fenolik madde miktarı

USE : Ultrasonik destekli ekstraksiyon

XTT : 2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Serbest radikal türleri.....6
Çizelge 2.2. Bazı reaktif oksijen türlerinin oluşum reaksiyonları.....7
Çizelge 2.3. DNA hasarı ve onarım yolları.....22
Çizelge 3.1. LC-MS/MS cihazının çalışma koşulları (Fenolik profil analizi).....51
Çizelge 3.2. Fenton reaksiyonu ile DNA'da oksidatif hasar oluşturulma koşulları.....53
Çizelge 3.3. LC-MS/MS cihazının çalışma koşulları (8-OH-2dG ölçümü).....54
Çizelge 4.1. Bitkilerden elde edilen ekstraktların yüzde (%) verimleri.....55
Çizelge 4.2. Toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/mg ekstrakt).....56
Çizelge 4.3. Toplam flavonoid miktarları (µg KE/mg ekstrakt).....57
Çizelge 4.4. Serbest radikal giderme metodlarında ekstraktların EC_{50} (µg/mL) değerleri.....60
Çizelge 4.5. Domat zeytin yaprağının ekstraksiyon süresinin TPC, TFC ve radikal giderme aktiviteleri üzerine etkisi.....61
Çizelge 4.6. Ekstraksiyon süresi ile analiz sonuçları arasındaki ilişki.....61
Çizelge 4.7. Analiz edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.....62
Çizelge 4.8. Çalkalamalı su banyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Hicaz türü nar kabuğu ekstraktının (Hicaz-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....66
Çizelge 4.9. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Hicaz türü nar kabuğu ekstraktının (Hicaz-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....67
Çizelge 4.10. Çalkalamalı su banyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Domat türü zeytin yaprağı ekstraktının (Domat-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....68
Çizelge 4.11. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Domat türü zeytin yaprağı ekstraktının (Domat-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....69
Çizelge 4.12. Çalkalamalı su banyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Gemlik türü zeytin yaprağı ekstraktının (Gemlik-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....70
Çizelge 4.13. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Gemlik türü zeytin yaprağı ekstraktının (Gemlik-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....71

Çizelge 4.14. Çalkalamalı subanyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Tetra yaprağı ekstraktının (Tetra-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....72
Çizelge 4.15. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Tetra yaprağı ekstraktının (Tetra-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler.....73
Çizelge 4.16. Örneklerin AML12 ve Hep3B hücre hatları üzerinde IC_{50} değerleri.....78
Çizelge 4.17. Tezde çalışılan bitkilerin fenolik ve flavonoid madde miktarlarının literatür ile karşılaştırılması.....83
Çizelge 4.18. Tezde çalışılan bitki ekstraktlarının oksidatif DNA hasarı üzerine olan etkilerinin literatür ile karşılaştırılması.....97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA'nın yapısı.....4
Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları.....8
Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hücresel hasar.....8
Şekil 2.4. Oksidatif denge.....9
Şekil 2.5. Oksidatif stresin nedenleri, hedefleri ve sonuçları.....10
Şekil 2.6. C5-OH katılmış pirimidin bazlarının indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları.....11
Şekil 2.7. Pürin bazlarının hidroksil radikali ile reaksiyonları.....12
Şekil 2.8. Fenton reaksiyonu ile DNA hasarı oluşumu.....13
Şekil 2.9. Oksidasyon sonucu DNA'da oluşan baz modifikasyonları.....14
Şekil 2.10. 8-Hidroksi guanin (8-OHGua)'in kimyasal yapısı.....15
Şekil 2.11. 8-Hidroksi-2'-deoksi guanozin'in oluşum mekanizması.....15
Şekil 2.12. Guanin bazının •OH ile reaksiyonları.....16
Şekil 2.13. Oksidatif hasara uğramış radikalik Guanin türlerinin reaksiyonları.....17
Şekil 2.14. İyonize radyasyonun Guanin bazı üzerine etkisi.....18
Şekil 2.15. 8-Hidroksiguaninin keto-enol tautomerizasyonu.....19
Şekil 2.16. DNA onarım mekanizmalarına örnekler.....24
Şekil 2.17. Antioksidan savunma mekanizmaları.....25
Şekil 2.18. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin sınıfları.....27
Şekil 2.19. Flavonoidlerin genel yapısı.....28
Şekil 2.20. Tetrazolyum bileşiklerinin kimyasal yapıları.....31
Şekil 2.21. MTT'nin formazana dönüşümü.....32
Şekil 2.22. Deneyde kullanılan Hicaz türü nar meyvesi ve kabukları.....34
Şekil 2.23. Nar kabuğunun içerdiği fenolik bileşikler ve kimyasal yapıları.....35
Şekil 2.24. Gallotanen ve Elajitanenin hidrolizi…….....36
Şekil 2.25. *Cotinus coggygria* (Tetra) bitkisi.....38

Şekil 2.26. *Cotinus coggygria* bitkisinin farklı kısımlarında bulunan bazı biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapıları.....38
Şekil 2.27. Zeytin yaprakları.....40
Şekil 3.1. Ekstrakt hazırlama basamakları.....46
Şekil 3.2. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan Gallik asit standart grafiği.....47
Şekil 3.3. Flavonoid tayini için kullanılan Kersetin standart grafiği.....48
Şekil 3.4. DPPH radikali ile antioksidan molekül (A-H) arasındaki reaksiyon.....49
Şekil 3.5. ABTS radikalinin oluşumu ve antioksidan molekül ile reaksiyonu.....50
Şekil 4.1. Ekstraktların DPPH radikali giderme güçleri 58
Şekil 4.2. Ekstraktların $ABTS^{+\bullet}$ giderme sonuçları.....59
Şekil 4.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların AML12 hücre hattı üzerinde etkileri (24 saat maruziyet) 75
Şekil 4.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların AML12 hücre hattı üzerinde etkileri (48 saat maruziyet).....76
Şekil 4.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların Hep3B hücre hattı üzerinde etkileri (24 saat maruziyet).....77
Şekil 4.6. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların Hep3B hücre hattı üzerinde etkileri (48 saat maruziyet) 78
Şekil 4.7. Fenton reaksiyonu ile oluşturulan oksidatif DNA hasarı üzerine ekstraktların koruyucu etkisi…….....79

EKLER DİZİNİ

Ek 1.1. Nar-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 118
Ek 1.2. Nar-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 119
Ek 1.3. Domat-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 120
Ek 1.4. Domat-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 121
Ek 1.5. Gemlik-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 122
Ek 1.6. Gemlik-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 123
Ek 1.7. Tetra-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 124
Ek 1.8. Tetra-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları……..... 125
Ek 2.1. 8-OH-2'-dHG kalibrasyon grafiği……..... 126
Ek 3.1. Buzağı timus DNA'sında Fenton reaksiyonu öncesinde ve sonrasında hasar ürünü ölçümü…… 127
Ek 3.2. Hicaz-USE ve Tetra-USE'nin DNA hasarı üzerine olan etkisi……..... 128
Ek 3.3. Domat-USE ve Gemlik-USE'nin DNA hasarı üzerine olan etkisi……..... 129
Ek 3.4. Mix ekstraktının (Tetra yaprağı+Nar kabuğu+Domat zeytin yaprağı ekstrakt karışımı) DNA hasarı üzerine olan etkisi……..... 130

BÖLÜM 1

GİRİŞ ve AMAÇ

Doğal bir kaynak olan bitkiler besleyici olmalarının yanında, sentezledikleri ikincil metabolitler sayesinde antiviral, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar, antidiyabetik aktivite gibi çeşitli biyolojik etkiler göstermektedirler. Gösterdikleri bu biyolojik aktivitelerinden dolayı son zamanlarda doğal bileşikler ve bitkisel ürünlere olan ilgi daha da artmıştır; özellikle kozmetik ürünlerde ve diyet takviye edici ürünlerde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca modern tıbbın önerdiği ilaç tedavisine paralel olarak; halk arasında bitkilerin kök, yaprak, dal ve kabuklarından hazırlanan çayların kullanımı da halen bir seçenek olarak devam etmektedir. Baharatlar, sebzeler ve meyveler gibi birçok bitkisel kaynağın gösterdiği antioksidan aktivite başta olmak üzere bu aktiviteler; flavonoid, fenolik asit, karotenoid, askorbik asit, tokoferol gibi fitokimyasal içeriklerinden kaynaklanmaktadır. Antioksidan özellikli bu doğal bileşenler, antiradikalik özelliklerini; lipid, DNA ve diğer biyomoleküllerin oksidasyonunu geciktirerek veya radikalik zincir reaksiyonlarının ilerlemesini engelleyerek sağlarlar.

Genom sürekli DNA hasarına neden olan çeşitli etkilere maruz kalmaktadır. Canlı organizmalarda endojen ve eksojen sebeplerle oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) bu hasar kaynaklarından en önemlisidir. Özellikle hidroksil radikali (•OH), çeşitli mekanizmalarla DNA'da baz ve şeker modifikasyonları, pürin veya pirimidin kayıpları, zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi değişiklikler oluşturmaktadır. ROS'lar DNA üzerinde yirmiden fazla oksidatif kaynaklı baz hasar ürününün oluşumuna yol açmaktadır. Guanin DNA bazları içinde oksidasyona en yatkın olan bazdır. Bu sebeple en sık oluşan hasarlı baz, guaninin C-8 atomuna hidroksil radikalinin saldırısıyla oluşan 8-hidroksi-2ˈ-deoksi guanozin (8-OH-2dG) dir ve 8-OH-2dG'in ölçülmesi DNA'daki oksidasyon kaynaklı hasarın bir göstergesidir. Bitkisel

kaynakların çeşitli biyoaktivite çalışmaları yapılmasına rağmen, DNA hasarı üzerine bitkilerin koruyuculuğuyla ilgili olarak yapılmış çalışmalara son yıllarda rastlanmaktadır. Bu bağlamda çalışma kapsamında nar kabuğu, tetra ve zeytin yapraklarının oksidatif DNA hasarını önleme konusundaki kapasitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan tetra, nar kabuğu ve zeytin yaprakları antioksidan aktivite yönünden araştırılmış ve yapılan in vitro deneylerde (Bektaş, 2011; Matic vd., 2013; Orak, Yağar ve Selen İşbilir, 2012a; Orak, Selen İşbilir ve Yağar, 2012b) yüksek antioksidan etkili oldukları belirlenmiştir. Dolayısıyla antioksidan etkili bu doğal materyallerin DNA'nın oksidatif hasara uğramasını engelleyeceği düşünülmüştür. Ayrıca, antioksidan özelliklerinden kaynaklanan oksidatif hasar önleme özellikleri bu bitkisel artıkların kullanımı için yeni ve önemli bir alan doğmasına yol açabilecektir.

Dünyada doğal kaynakların sınırlı olması, bu kaynakların verimli ve etkin kullanılmasını gerektirmektedir. Pek önem verilmeyen bazı bitkisel atıklar önemli kimyasal içeriklerinden dolayı halihazırda özellikle gıda, kozmetik, ilaç ve parfümeri gibi alanlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Cavalcanti, vd., 2022). Örneğin gıda maddelerinde doğal renklendirici olarak en yaygın kullanılan karotenoid ekstraktları yonca ve narenciye kabuklarından; antosiyaninler şarap endüstrisinin yan ürünlerinden elde edilmektedir. Kozmetik ve farmasötik alanında aroma ve koku veren özellikle esansiyel yağların bazıları turunçgil meyvelerinin kabuklarından, odun ve ağaç kabuklarından elde edilmektedir. Öjenol üretiminin bir yan ürünü olarak karanfil yağından ekstrakte edilen karyofilen, koku bileşiklerini sentezlemek için kullanılan bir başlangıç maddesidir. Bu tür ekstraktların doğal kaynaklardan, özellikle de besin değeri olmayan, bir endüstriyel yan ürün veya atık ürün olan kaynaklardan elde edilmesi sürdürülebilirlik ve kaynakların verimli kullanımı açısından önem arz etmektedir. Bu sebeple çalışmada kullanılan ekstraktların atık ürün olan nar kabukları ile, insan diyetinde kullanılmayan tetra ve zeytin yapraklarından elde edilmesi onların potansiyel ticari uygulama alanı bulabilmesi yönünden önemlidir.

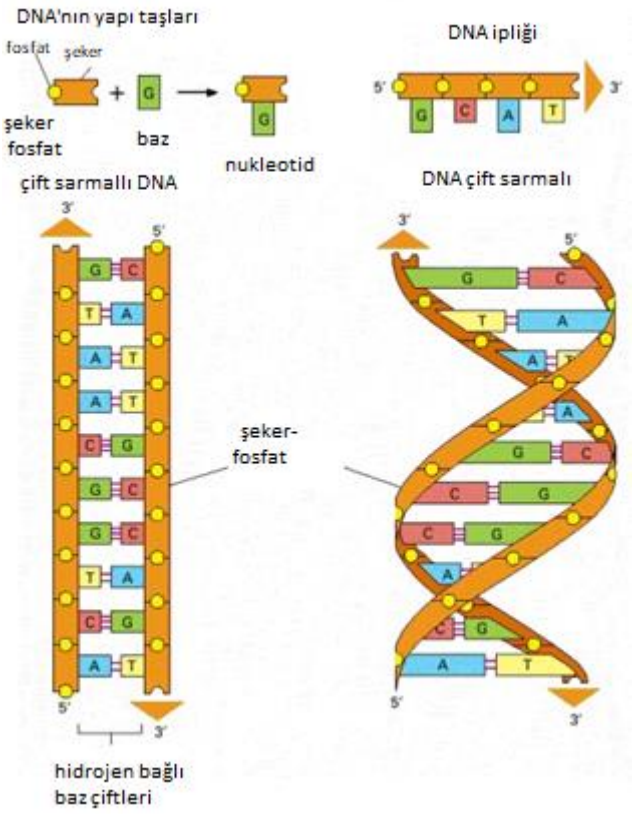
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Deoksiribonükleik asit (DNA)

Nükleik asitler, nükleotid yapı taşlarından oluşan biyopolimerlerdir. Nükleotidler, azot içeren bir baz, fosfat ve beş karbonlu şekerden oluşmaktadır. DNA'daki nükleotidlerin yapısında Adenin, Guanin (pürin bazları), Timin veya Sitozin (pirimidin bazları) bazları, şeker olarak deoksiriboz ve tek bir fosfat yer almaktadır. Herhangi bir bazın riboz şeker molekülüne veya deoksiriboz şeker molekülüne N-glikozit bağıyla bağlanmasıyla nükleozit oluşmaktadır. Bağlanan şekere göre, ribonükleozid veya deoksiribonükleozid meydana gelir. DNA zincirinde nükleotidler birbirlerine şekerler ve fosfatlar arasındaki kovalent bağlar ile bağlanırlar. Bu kovalent bağ bir şeker molekülünün 5' karbonundaki hidroksil grubu ile sonrakinin 3' karbonundaki hidroksil grubu arasında meydana gelen fosfodiester bağıdır (Şekil 2.1).

Watson ve Crick 1953'te DNA'nın çift sarmal yapısını ortaya çıkarmışlardır. DNA çift sarmalı, iki polinükleotid zincirlerinin yapısal ve kimyasal özellikleri sayesinde üç boyutlu yapıya sahiptir. İki polinükleotid zinciri bazlar arasında oluşan hidrojen bağları ile birarada tutulmaktadır. Böylece tüm bazlar çift sarmalın iç kısmında bulunurken, şeker-fosfat omurgaları dış kısımda yer almaktadır.



Şekil 2.1. DNA'nın yapısı (Alberts vd., 2002)

Nükleik asitlerin fosfodiester bağları nükleazlar tarafından kırılır. Hücrelerde eksonükleazlar ve endonükleazlar olmak üzere iki nükleaz sınıfı bulunmaktadır. DNA'nın bir ucundan başlayarak parçalayan eksonükleazlar, çift zincirli DNA'nın sadece bir tek zincirinden veya tek zincirli DNA'nın 5′ veya 3′ ucundan nükleotidleri ayırırlar. Ayrıca hücresel metabolizmanın korunmasında ve genomun stabilitesi için gereklidirler (Mason ve Cox, 2012). Endonükleazlar ise daha küçük parçalar oluşturmak üzere DNA zincirinin veya molekülünün iç kısmından kesmeye başlarlar. Spesifik DNA bölgelerini tanıyarak özgül nükleotid dizilerinden kesim yapan restriksiyon endonükleazlarının biyoteknolojik önemleri vardır.

Tek veya çift sarmallı DNA spesifik nükleazlar ile oligonükleod ve nükleotidlerine parçalanabilir. Ayrıca DNA formik asit (60°C'de) (Aybastıer, Dawbaa ve Demir, 2018a; Aybastıer vd., 2018b) ve perklorik asit (100°C'de) ile de bozulabilir veya parçalanabilir. Parçalanma sonucunda oluşan ürün karışımı kromatografi, elektroforez gibi teknikler ile ayrılır ve karışımda yer alan bazların miktarı ölçülebilir (Aybastıer vd., 2018a; Aybastıer vd., 2018b).

2.2. Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri, biyolojik sistemlerin en önemli serbest radikalleri olarak bilinmektedir ve 21. yüzyılın başlarında reaktif oksijen türlerinin biyokimyası ile biyomedikal bilimlerin ilişkisinin önemi de artmıştır. Serbest radikaller oksijenin kısmi indirgenmesi ile oluşmaktadır. Reaktivitesi yüksek ve son atom yörüngesinde ortaklanmamış elektronu olan kimyasal ürünlerdir. Sahip oldukları yüksek reaktiviteleri, yapılarındaki kararsızlıktan kaynaklanmaktadır (Akkuş, 1995). Yaşam sürelerinin kısa olmasına rağmen, serbest radikallerin hücre bileşenleriyle etkileşmesi sonucunda, önemli biyolojik moleküllerin işlevlerini kaybetmesine yol açmaktadırlar (Inglett, Chem, Berhow ve Lee, 2011). İnsan vücudunda doğal metabolik yollarda meydana gelen serbest radikaller, kardiyovasküler hastalık, katarakt, inflamasyon, kanser gibi patolojik durumlara yol açmaktadırlar (Yen ve Wu, 1999; Lobo vd., 2010). Ayrıca serbest radikallerin, karsinojenezin başlama ve ilerleme aşamalarında etkili olabileceği belirtilmiştir (Klaunig ve Kamendulis, 2004).

Güçlü oksidanlar olan serbest radikaller hücresel aktiviteler sırasında elektron transferi gerçekleşen anabolik ve katabolik reaksiyonlarda, mitokondriyel elektron taşıma sisteminde ve sitokrom P450 sisteminde oluşan elektron kaçakları sonucunda meydana gelmektedir (Yerer ve Aydoğan, 2000). Oksidatif hasar oluşturan moleküllere ek olarak; yanlış baz eşleşmeleri, deaminasyon, baz kayıpları, replikasyon hataları, kolesterol ve östrojen metabolitleri ve lipid peroksidasyon ürünleri de DNA'nın hasarlanmasına yol açan diğer endojen faktörlerdir (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015; Onur, Tuğrul ve Bozyiğit, 2009). Endojen faktörlerin yol açtığı hasar onarılmadığında, somatik mutasyonlar oluşmaktadır (Onur vd., 2009). ROS oluşumunda ekzojen faktörler arasında fiziksel ve kimyasal ajanlar yer almaktadır. Bunlar, kemoterapide kullanılan ilaçlar, benzopren, vinil klorür, aflotoksin, bazı radyasyonlar örneğin UV ve iyonize radyasyondur (Burçak ve Andican, 2004; Karabulut ve Gülay, 2016).

Reaktif oksijen türleri, radikaller (elektron alışverişi yapabilen oksidanlar) ve radikal olmayanlar (elektronları tam olan ancak başka moleküller ile bir araya gelebilen oksidanlar) olmak üzere iki gruba ayrılabilirler (Halliwell, 2006).

Çizelge 2.1. Serbest radikal türleri

Radikaller
Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$)
Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$)
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)
Peroksil ($ROO^{\bullet}$)
Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)
Azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$)
Nitrat radikali ($NO_3^{\bullet}$)
Lipit peroksil ($LOO^{\bullet}$)
Radikal olmayanlar
Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Singlet oksijen ($^1O_2$)
Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Peroksinitröz asit (ONOOH)
Organik hidroperoksit (ROOH)
Nitroksil anyonu (NO^-)
Nitril klorür (NO_2Cl)
Ozon (O_3)
Hipokloröz asit (HOCl)
Hipobromöz asit (HOBr)
Lipid hidroperoksitleri (LOOH)

Yaşamın devamı için gerekli olan mitokondrial elektron transport sisteminden kaynaklanan elektron kaçakları, enerji dönüşüm esnasında oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır (Kovacic, Pozos, Somanathan, Shangari ve O'Brien, 2005; Valko, Izakovic, Mazur, Rhodes ve Telser, 2004). Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), oksijen molekülüne bir elektron eklenmesi ile oluşmaktadır (Valko vd., 2007) ve reaktivitesi düşüktür. Genelde hücre mitokondrisi içerisinde üretilir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest radikal olmadığı halde, ROS öncüsü olarak mitokondride üretilir (Inoue vd., 2003) ve hidroksil radikali gibi yüksek reaktivitesi olan

oksidanların oluşumuna yol açar (Larson, 1988). Bunun dışında, hücre içi sinyal molekülü olarak da fonksiyon göstermektedir. Oksijen molekülüne iki elektron, $O_2^{\bullet-}$'ye ise bir elektron ilavesi ile hidrojen peroksit oluşmaktadır (Messner ve Imlay, 2002; Miller, Buettner ve Aust, 1990). Süperoksit radikali tarafından oluşan H_2O_2, DNA hasarına yol açmaktadır (Burçak ve Andican, 2004). Antioksidan enzim sistemi olarak bilinen glutatyon peroksidaz ve katalaz sayesinde hidrojen peroksit giderilmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Ayrıca hidrojen peroksit yağda çözünme özelliği sayesinde, meydana geldiği yerden uzak olan hücresel membranlarda Fe^{2+} varlığında hasara neden olmaktadır (Akkuş, 1995; Özcan, Erdal, Çakırca ve Yönden, 2015). H_2O_2 radikalik hasarı oluştuğu yerden uzağa taşımasından dolayı serbest radikal kimyasında önemli rol oynamaktadır.

Çizelge 2.2. Bazı reaktif oksijen türlerinin oluşum reaksiyonları

Süperoksit radikali	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$
Süperoksit radikali	$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$
Peroksit	$O_2 + 2\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$
Peroksit	$O_2^- + 1\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$
Hidrojen peroksit	$O_2^{-2} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
Hidroksil radikali	$H_2O_2 + Cu^+/Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Cu^{+2}/Fe^{3+}$

Biyolojik sistemlere en reaktif ve en fazla zarar veren radikal hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) dir. Cu^+, Fe^{+2}, Zn, Cr, Mo, Ni, Mn ve Co gibi elementlerin olduğu ortamda Haber-Weiss veya Fenton reaksiyonlarıyla hidrojen peroksitin indirgenmesiyle oluşmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016; Özcan vd., 2015; Burçak ve Andican, 2004).

Süperoksidin direkt olarak H_2O_2 ile reaksiyonu olarak tanımlanan Haber-Weiss reaksiyonu, katalizör varlığında veya katalizörsüz gerçekleşebilir. Ancak katalizörsüz reaksiyon yavaş ilerlerken, demir ile katalizlenen reaksiyon çok hızlıdır. Bu reaksiyonda, öncellikle demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından demir (Fe^{2+})'e indirgenir ve sonrasında Fenton reaksiyonu ile H_2O_2'den $^{\bullet}OH$ ve ^{-}OH oluşur (Şekil 2.2). Fe^{2+} ile hidrojen peroksitin, hidroksil radikali oluşturduğu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Cu, Fe, Zn gibi metaller, oksidatif stres oluşturan güçlü oksidan olan reaktif hidroksil radikal oluşumunda rol almaktadır.

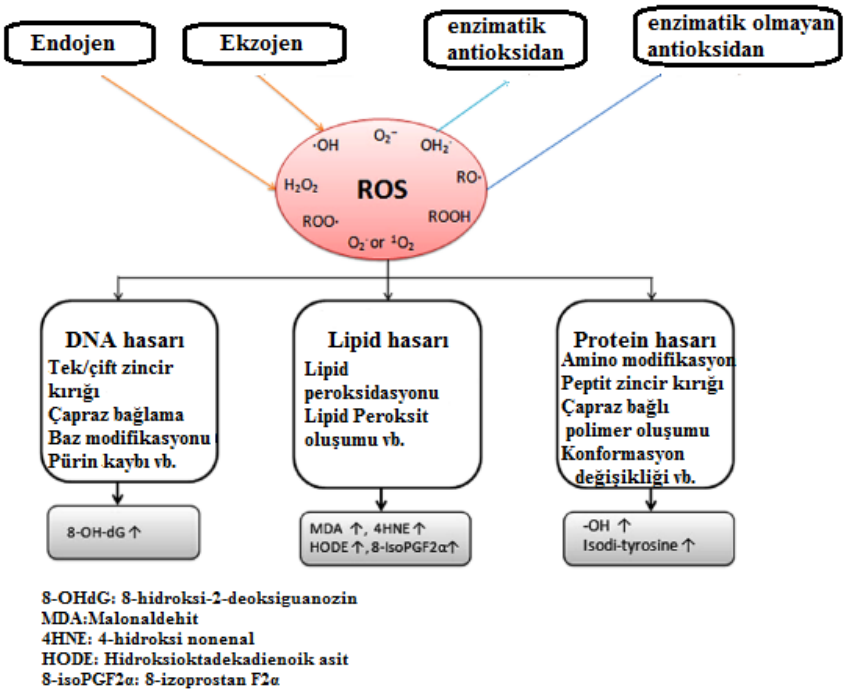
$$O_2^{\bullet -} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{-} + Fe^{+3} \quad \text{(Fenton reaksiyonu)}$$

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{-} + O_2 \quad \text{(Haber-Weiss reaksiyonu)}$$

Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları (Nimse ve Pal, 2015)

Yüksek derecede toksik olan hidroksil radikali öncelikle DNA'yı hedef alır ve 8-OH-2dG oluşumunu gerçekleştirerek oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır (Qi vd., 2000). Ayrıca DNA molekülünün bütün bileşenleri ile tepkimeye girebilen ve pürin, pirimidin bazları ve deoksiriboz omurgaya zarar verebilen (Dizdaroğlu, Jaruga, Birincioglu ve Rodriguez, 2002) hidroksil radikali, hücresel fonksiyon bozukluğuna ve DNA zincirinde kopmalara yol açmaktadır (Skala vd., 2016). Özellikle enerji üretimi sırasında oluşan bu serbest radikaller nükleik asitlerin yanısıra lipitlerin ve proteinlerin yapısında da değişiklik meydana getirebilmektedir (Shinde, Ganu ve Naik, 2012).

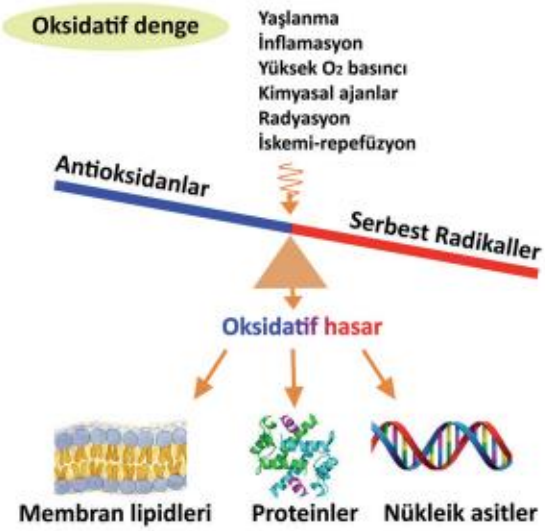


Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar (Zhao vd., 2016)

2.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türlerinin DNA'ya Etkisi

Oksidatif stres, vücutta doğal metabolik yollar ile meydana gelen serbest radikallerin, çeşitli nedenlerden dolayı artması nedeniyle ve yetersiz antioksidan mekanizmalarından dolayı oluşan patolojik bir olaydır (Atmaca ve Aksoy, 2009).

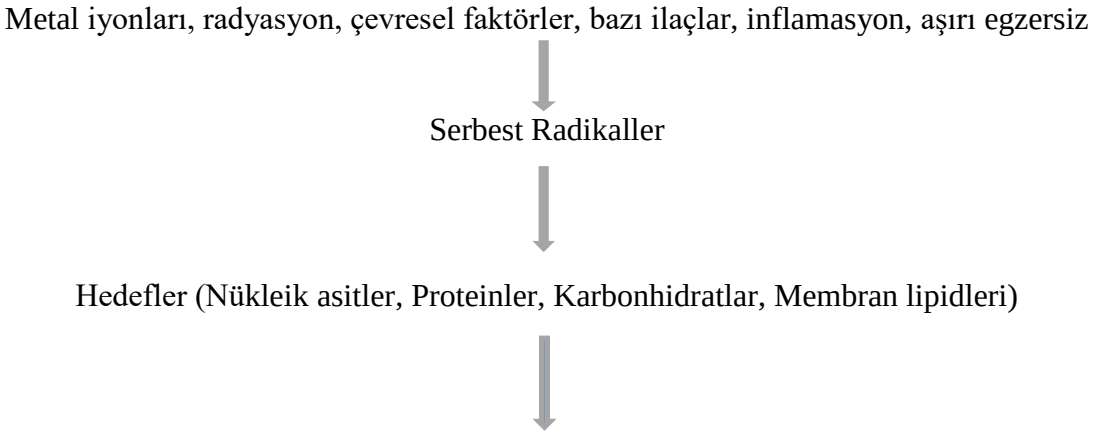
Organizmanın normal fonksiyon görmesi için serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında olan denge çok önemlidir (Valko vd., 2007). Dengenin bozulması, radikallerin hücrelerde birikmesi veya endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalmasından dolayı gerçekleşir ve bu dengesizlik sonucunda oksidatif stres meydana gelerek, biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşabilmektedir (Monaghan, Metcalfe ve Torres, 2009; Maddu, 2019). Oksidatif stres sonucunda serbest radikallerin artmasıyla hücre proteinleri, lipidleri ve DNA'sı etkilenerek farklı hastalıklar oluşabilir (Valko vd., 2007) (Şekil 2.4). Oksidatif stresle ilişkilendirilen hastalıkların bazıları karaciğer hastalıkları, göz hastalıkları, akciğer hastalıkları (KOAH), kanser, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, infertilite, diyabet ve deri hastalıklarıdır (Dasgupta ve Klein, 2014).



Şekil 2.4. Oksidatif denge (Özcan vd., 2015)

Oksidatif stres nükleik asitlerde de hasara yol açmaktadır (Atmaca ve Aksoy, 2009). DNA hasarı, genetik materyalin moleküler bütünlüğünde çeşitli faktörlerden etkilenerek oluşan tüm değişiklikler olarak da bilinmektedir (Kulaksız ve Sancar, 2007). Oksidatif hasar, nükleer

DNA dışında, mitokondriyal DNA'da da oluşmaktadır. Bu hasar, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, DNA-protein çapraz bağlanması, zincir kırıkları gibi değişiklikler oluşturmaktadır (Cooke, Evans, Dizdaroğlu ve Lunec, 2003; Dizdaroğlu, Coskun ve Jaruga, 2015). ROS ile oluşan oksidatif DNA hasarı onarılmadığı takdirde, kanser gelişimi, tek hücreli organizmalarda hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda ise dejenerasyon ve yaşlanma gibi mutasyonlar meydana getirebilir (Sancar, Lindsey-Boltz, Ünsal-Kaçmaz ve Linn, 2004).

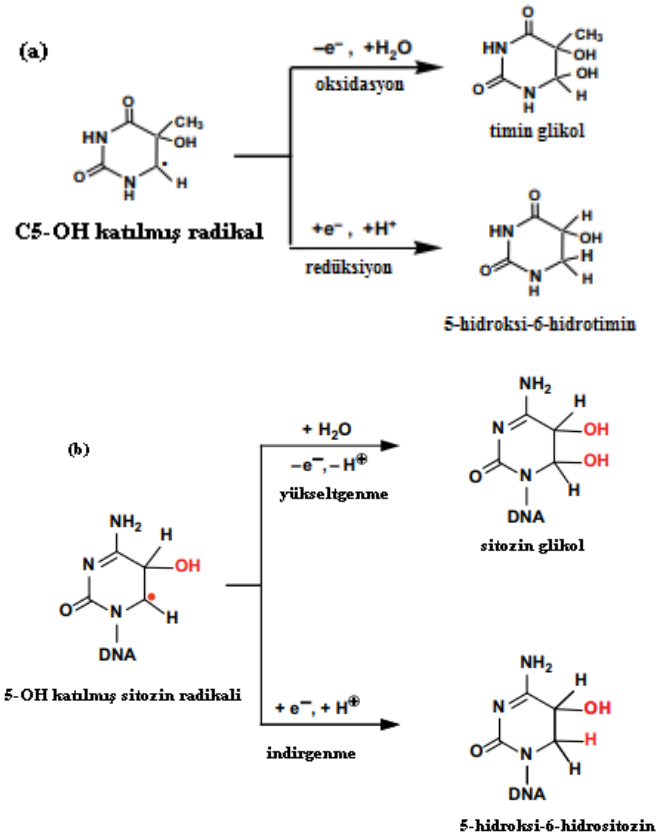


Şekil 2.5. Oksidatif stresin nedenleri, hedefleri ve sonuçları (Ferreira, Barros ve Abreu, 2009)

Oksidatif stres durumunda artan serbest radikalleri, hücre içinde bulunan DNA ile tepkimeye girerek, sitotoksisiteye, mutasyona ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Akkuş 1995; Forlenza ve Miller, 2006). Özellikle hidroksil radikali DNA'nin bileşenleriyle reaksiyona girerek deoksiriboz şekerini, pirimidin ve pürin bazlarını zarara uğratmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Hasarlı bazlardan bazıları sitozin-glikol, timin-glikol, 8-hidroksi-2′-deoksi guanozin (8-OH-2dG), FAPyAdenin ve FAPyGuanin'dir. Bazlar ayrıca DNA replikasyonu veya onarımı sırasında da oksidasyona uğrayabilir. DNA'daki bazı oksidatif modifikasyonlar somatik mutasyonlara neden olur ve hücresel işlevleri değiştirir. ROS kaynaklı mutasyonlar genellikle geçiş metallerinin bağlandığı ('hot spot') DNA bölgelerinde kümelenir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

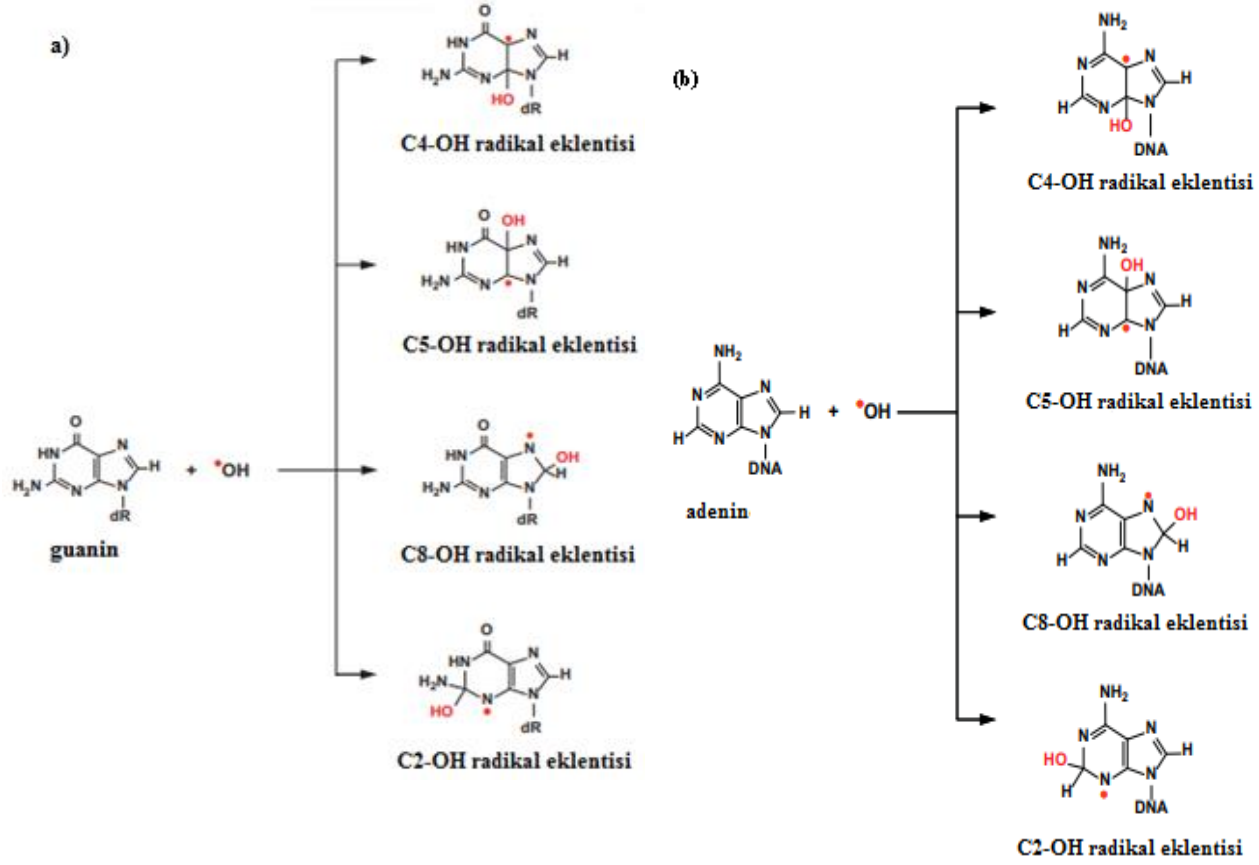
DNA ile serbest radikallerin etkileşim sonrası, şekere hidrojen atomları ilave edilmekte veya şekerden H atomu çıkabilmektedir. Hidroksil radikalinin saldırısından pirimidinin C4-C5

arasındaki çift bağı etkilenmekte ve oksidatif pirimidin hasar ürünleri oluşmaktadır. Pürinlere •OH saldırı sonrası ise başta 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin olmak üzere çeşitli hidroksillenmiş türevler meydana gelmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016). ROS saldırısı sonucu oluşan pürin ve pirimidin radikalleri de farklı mekanizmalarla çeşitli ürünler oluşturabilir. Örneğin, pirimidinlerin OH-katılmış radikalleri ve allil radikalleri gibi ürünlerinin indirgenmesi veya oksidasyonu redoks ortamına, oluşan ürünlerin redoks özelliklerine ve reaksiyona girenlere bağlıdır. Ürün oluşumu, oksijen varlığında veya yokluğunda ya da diğer koşullarda meydana gelebilir. Şekil 2.6'de görüldüğü gibi C5-OH katılmış radikalik pirimidin türlerinin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile timin glikol, sitozin glikol, 5-hidroksi-6-hidrositozin veya 5-hidroksi-6-hidrotimin gibi oksidatif hasar ürünleri oluşmaktadır (Dizdaroğlu, Holwitt, Hagan ve Blakely, 1986; Dizdaroğlu, Laval ve Boiteux, 1993; Wagner vd., 1994).



Şekil 2.6. C5-OH katılmış pirimidin bazlarının indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları (Evans, Dizdaroğlu ve Cooke, 2004)

Pürinlerde ise C2, C4, C5, C8 pozisyonlarına hidroksil radikalinin eklenmesiyle C2-OH, C4-OH, C5-OH ve C8-OH eklenmiş radikaller ve azot merkezli radikal oluşabilir (Şekil 2.7). Hidroksil radikali, elektrofilik doğası gereği elektron yoğunluğu yüksek olan yerlere saldırır. Yapılandırılan pürin radikallerinin ($^{-}H^{\bullet}$) oksidasyonu, redüksiyon veya dehidratasyonu sonucunda başka oksidatif hasar ürünleri de oluşmaktadır (Viera ve Steenken, 1990; Dizdaroğlu vd., 2002).

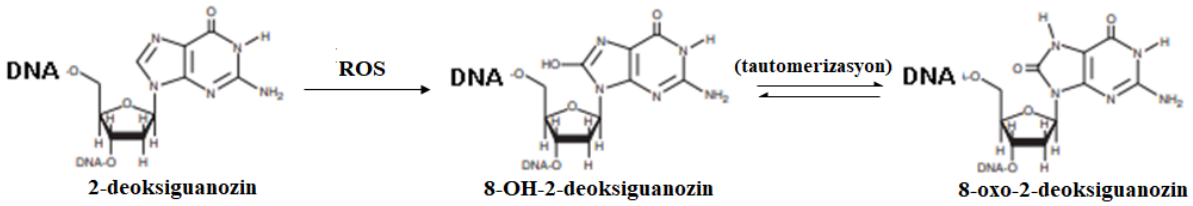


Şekil 2.7. Pürin bazlarının hidroksil radikali ile reaksiyonları (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012)

Hidroksil radikali ve singlet oksijen ($^{1}O_2$) DNA bazlarına saldırdığında guaninden 8-OHdG ve FAPyGuanin ürünleri oluşturur (Cadet, Douki, Gasparutto ve Ravanat, 2003). Ayrıca reaktif oksijen metabolitleri hücre içi DNA'da bulunan Cu^{2+} iyonlarının belirli fenollerle (2-metoksiöstradiol, dietilstilbestrol, 2-hidroksiöstradiol, L-DOPA) reaksiyona girmesiyle de oluşabilir ve böylece DNA'da baz modifikasyonları, dallanma ve baz-fenol katılma ürünleri gibi

çeşitli hasarlar meydana gelir (Halliwell ve Aruoma, 1991; Li ve Trush, 1994; Milligan ve Ward, 1994).

Sahip olduğu fosfat grupları (PO_4^{2-}) sayesinde DNA polimeri anyonik yapıdadır. Bu nedenle $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ gibi çeşitli katyonları bağlayabilmektedir. Oksidatif stres sırasında $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ bağlı olduğu proteinlerden ayrılarak DNA'ya bağlanmaktadır. DNA molekülü, redoks aktif geçiş metal iyonlarının bağlanmaları sayesinde H_2O_2'in hedefi haline gelmektedir (Burçak ve Andican, 2004). Bu geçiş metal iyonları, baz modifikasyonun etkilenmesinde rol oynar. Şekil 2.8'de Fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalinin sebep olduğu DNA oksidasyonu şematize edilmiştir.

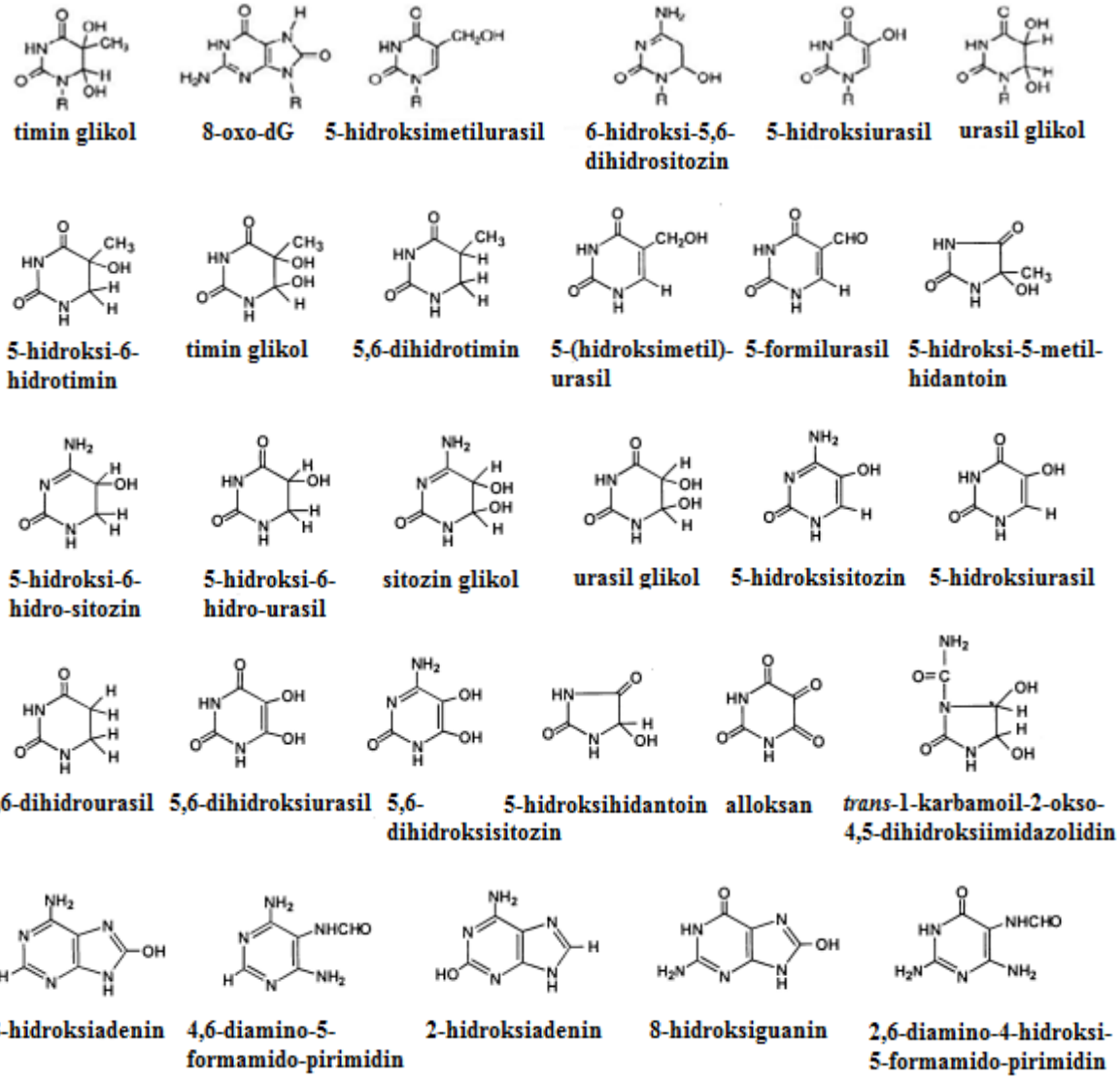


Şekil 2.8. Fenton reaksiyonu ile DNA hasar oluşumu (Fernandez vd., 2011)

Radikal temizleyiciler ile demir şelatörleri beraber kullanıldığında DNA'da oluşan oksidatif hasara karşı faydalı olduğu bildirilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Doku kültür ortamında Cu^{2+} ile Fe^{3+} iyonlarının artması ile DNA hasarının arttığı bilinmektedir. Hücrelerin H_2O_2 maruziyetinden sonra Cu/Fe şelatörlerinin kullanımı ile DNA'da oluşan oksidatif hasar önlenebilmektedir (Zastawny vd., 1995).

2.4. DNA'nın Oksidatif Hasar Belirteci

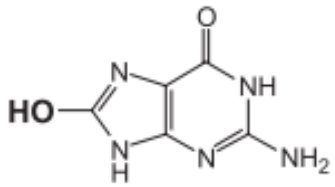
DNA'da oksidatif kaynaklı hasar meydana geldiğinde genellikle oksidatif değişime uğramış DNA bazları analizlenmektedir. Reaktif oksijen türleri DNA'da yirmiden fazla hasarlı baz ürünü oluşturmaktadır (Şekil 2.9) (Aybastıer vd., 2018b; De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi, 2002). Bunların bazıları 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin, 8-hidroksi guanin, 2-hidroksi adenin, urasil glikol, 5-hidroksi sitozindir.



Şekil 2.9. Oksidasyon sonucu DNA'da oluşan baz modifikasyonları (Dizdaroğlu vd., 2002)

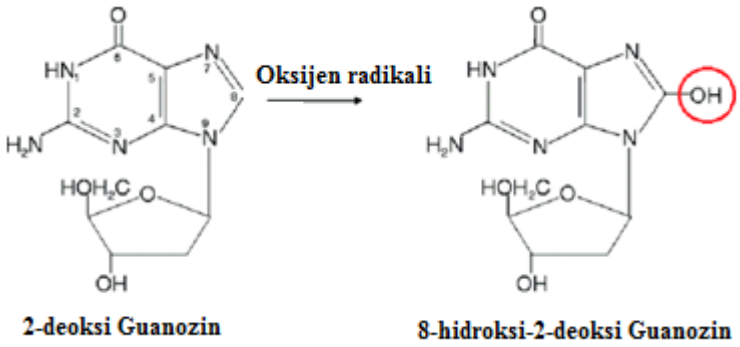
DNA bileşenleri arasında guanin en düşük iyonizasyon potansiyeline (1,29 V) sahip olduğu için iyi bir elektron vericidir ve serbest radikallerden en fazla etkilenen bazdır (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012; McDorman, Pachkowski, Nakamura, Wolf ve Swenberg, 2005; Jaruga vd., 2000). Ayrıca, DNA'da G-C'lu kısımlarda fazlalıkla Cu^{2+} iyonları bulunduğu için Guanin bazı oksidatif hasardan daha fazla etkilenir (Burçak ve Andican, 2004; Jaruga vd., 2000). Bu sebeple 8-OHGua ve 8OH-2dG ölçümü, DNA'daki oksidasyon hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Burçak ve Andican, 2004; Dizdaroğlu vd., 2015).

8-hidroksiguanin (8-OHGua) 1980'lerin başlarından beri hasar gören DNA'da tanımlanmış ve güçlü mutajenitesi ve kolay ölçümü nedeniyle en çok araştırılan DNA ürünü olmuştur (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012). 8-OHGua, DNA bazı adenin ile baz çifti oluşturabilmekte ve mutasyon oluşumuna yol açabilmektedir (Burçak ve Andican, 2004).



Şekil 2.10. 8-Hidroksi guanin (8-OHGua)'in kimyasal yapısı

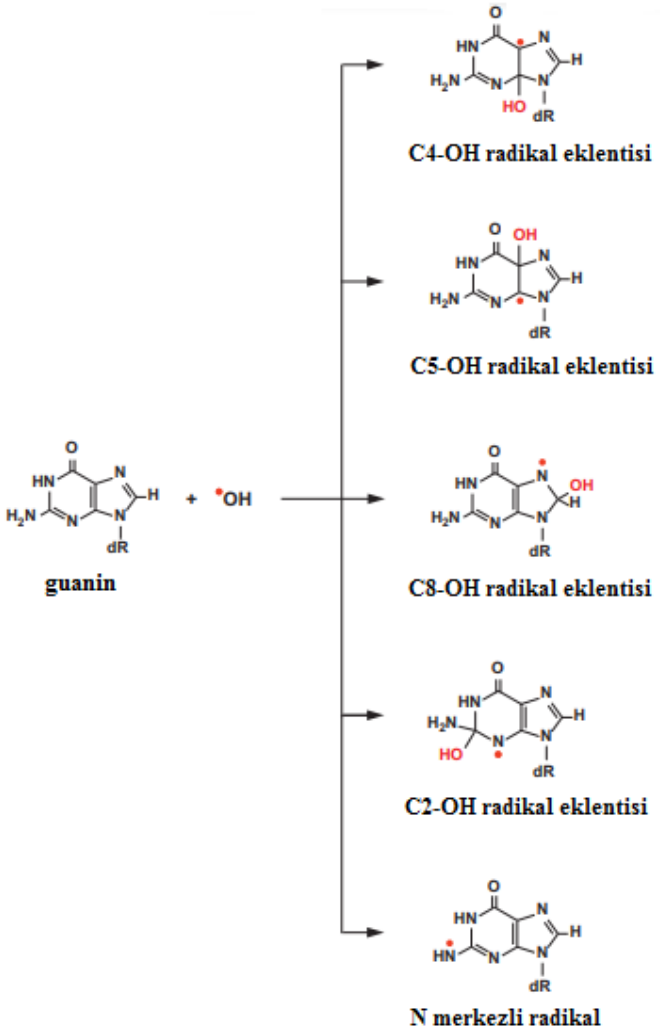
Oksidatif hasar sonucu DNA'da oluşan 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin (8-OH-2dG veya 8-oxo-dG) ürünü (Şekil 2.11) karsinojenez ile ilgili bir diğer önemli biyobelirteçtir. Bunun nedeni replikasyon sırasında uyumsuzluğa sebep olması ve ardından G-T transversiyonlarına yol açmasıdır (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi, 2002; Yokuş ve Çakır, 2002).



Şekil 2.11. 8-Hidroksi-2′-deoksi guanozin'in oluşum mekanizması

Hidroksil radikali, DNA pürin ve pirimidin bazlarına karşı son derece reaktiftir (Yu, Cui, Niedernhofer ve Wang, 2016). Guanin bazının C4, C5, C8 pozisyonlarına ve daha az olarak da C2 pozisyonuna katılabilir, $-NH_2$ grubundan bir $H^{\bullet}$ koparark azot merkezli bir radikal oluşturabilir (Şekil 2.12). Hidroksil radikali elektrofilik özellikte olduğu için, elektron yoğunluğu olan yerlere saldırır ve bu katılma reaksiyonları indirgeyici veya yükseltgeyici gücü olan çeşitli hidroksillenmiş radikalik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu katılma ürünleri farklı redoks

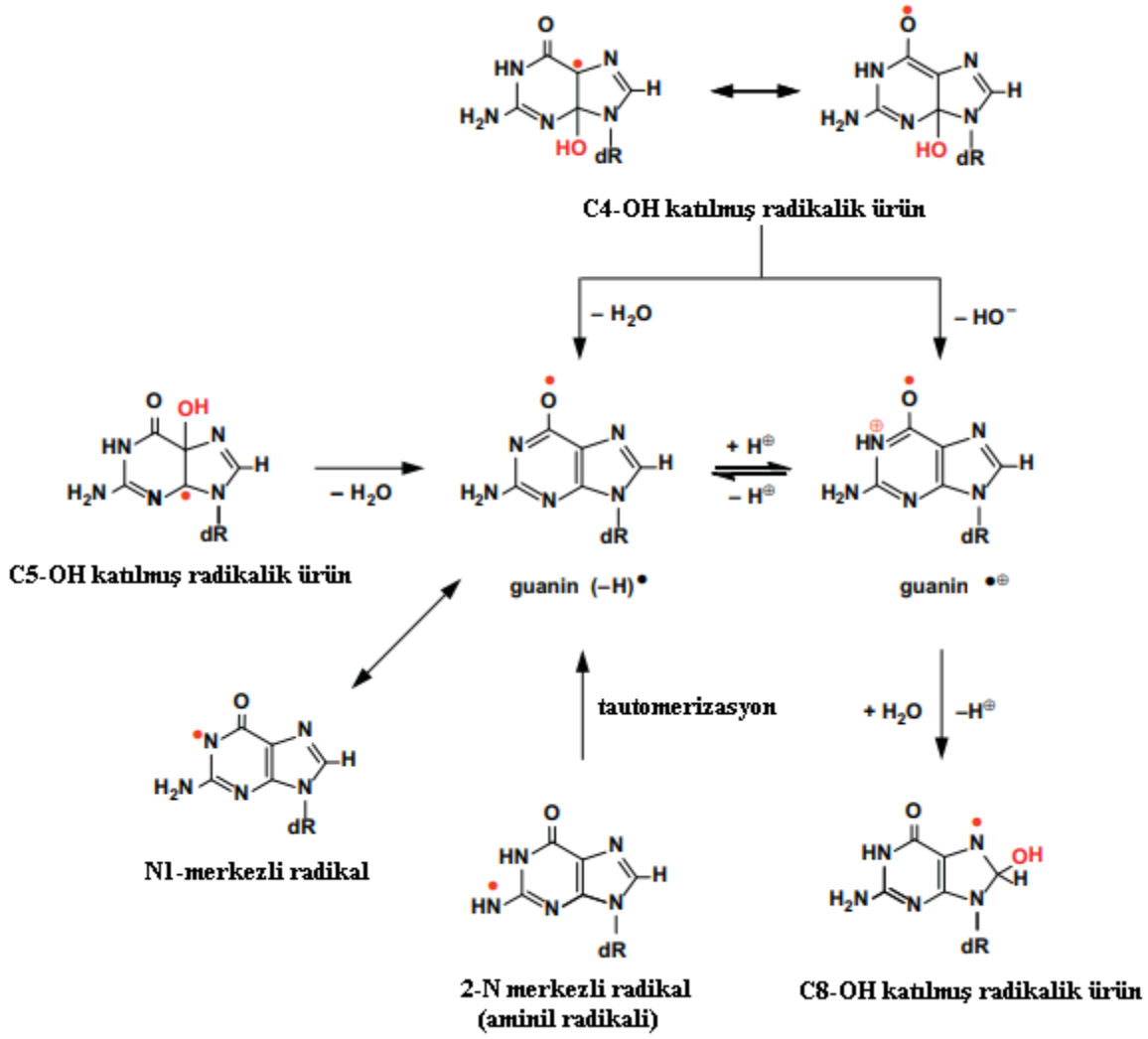
özelliklerine sahip oldukları için C4-OH radikalik ürünü yükseltgeyici iken, C5-OH- ve C8-OH-radikalik ürünleri indirgeyici özelliktedir (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi, 2002; Yokuş ve Çakir, 2002) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Guanin bazının •OH ile reaksiyonları (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012)

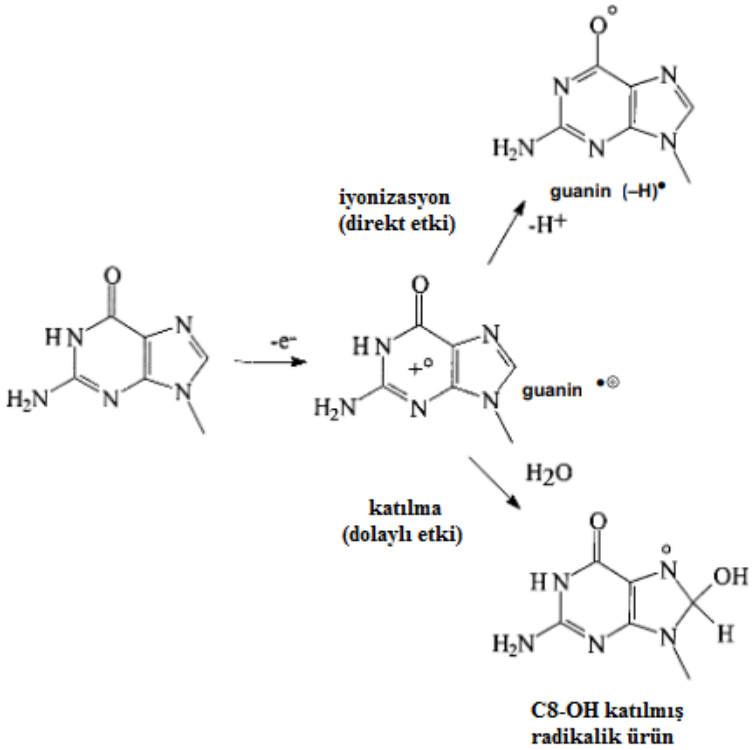
C4-OH katılmış radikalik ürün %65-70, C8-OH katılmış radikalik ürün %17 ve C5-OH katılmış radikalik ürün %10'dan az oranda oluşmaktadır. C4-OH radikalik üründe su ayrılması ile nötral guanin radikali (Gua(-H)•) oluşur ve o da guanin radikal katyonu ($Gua^{\bullet+}$) vermek üzere hemen protonlanır. C5-OH radikalik ürününde de Gua(-H)• oluşturak üzere su eliminasyonu gerçekleşir. C2-OH radikalik ürünü %1,5 kadar oluşur ve ondan amonyak ayrılır. Bu radikalik ürünün oksidasyonu ksantin oluşumuyla sonuçlanabilir. Guaninin 2. karbonundaki amino

grubundan bir H• ayrılması sonucu 2-N merkezli radikal (aminil radikali) oluşur, ancak tautoremizasyon sonucu hemen Gua(-H)•'ne dönüşür. Yani C4-OH katılma radikalinden su eliminasyonu ile ve 2-NH_2 grubundan H• ayrılması ile aynı tür oluşur. Ancak moleküler çalışmalara göre guanin için 2-NH_2'den H• çıkması enerjetik açıdan gaz fazda daha fazla mümkün olurken, sulu fazda ise N1 ve N9'dan H• çıkması daha fazladır. Şekil 2.13.'de oksidatif hasara uğramış Guanin bazından oluşan radikalik türevlerin reaksiyonları görülmektedir (Candeias ve Steenke, 2000; Naumov ve von Sonntag, 2008; Kumar, Pottiboyina ve Sevilla, 2011; Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012).



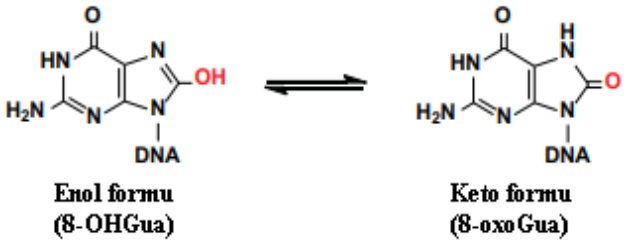
Şekil 2.13. Oksidatif hasara uğramış radikalik Guanin türlerinin reaksiyonları (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012; Cadet ve Wagner, 2013)

Guanin bazının oksidasyonu sonucu oluşan Gua(-H)$^{\bullet}$ ve Gua$^{\bullet+}$ indirgenme potansiyeli 1,29V olan güçlü oksidanlardır. Gua(-H)$^{\bullet}$ tekrar guanine indirgenebilir, Gua$^{\bullet+}$'nin hidrasyonu ise 8-OH katılmış radikalik türün oluşumuna neden olabilir. Gua$^{\bullet+}$'nin 8. karbonuna su katılma reaksiyonu ekzotermiktir (-315,2 kj/mol), Gua(-H)$^{\bullet}$'nin bu reaksiyonu ise endotermiktir (+123 kj/mol). Ayrıca Gua$^{\bullet+}$'nin N1-pozisyonunda proton bulunması da su katılması için önemlidir (Steenken ve Jovanovic, 1997; Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012). DNA'daki guanin bazının iyonize radyasyona maruz kalması sonucu da Gua$^{\bullet+}$ oluşur. Yukarıda belirtildiği gibi, Gua$^{\bullet+}$'ya su katılması ile C8-OH katılmış radikalik ürün meydana gelir ve iyonize radyasyonun direk ve dolaylı etkisi aynı guanin türevini oluşturur (Şekil 2.14). UV radyasyonu ve singlet oksijen de Gua$^{\bullet+}$ oluşturabilir. Bu etkilerin sonucunda meydana gelen Gua$^{\bullet+}$ üzerinden 8-OH-Gua son ürünü oluşur (Ravanat, Douki ve Cadet, 2001; Dizdaroğlu, Kirkali ve Jaruga, 2008). Gua(-H)$^{\bullet}$ 8-OH-Gua oluşumuna katılmaz, ancak DNA'nın iskeletini oluşturan deoksiriboz şekeri ile etkileşime girerek şekerin karbonlarından H$^{\bullet}$ koparır ve DNA zincir kırıklarına neden olur.



Şekil 2.14. İyonize radyasyonun Guanin bazı üzerine etkisi (Ravanat, Douki ve Cadet, 2001)

Oksidatif hasar sonucu oluşan 8-OH-2′dGua enol formundadır ve tautomerizasyon ile keto formuna dönüşür (Şekil 2.15). 8-Oksoguanin de guanin bazıyla ilgili oksidatif DNA hasarı ürünleri arasındadır.



Şekil 2.15. 8-Hidroksi guanin'in keto-enol tautomerizasyonu (Dizdaroğlu ve Jaruga, 2012)

2.5. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

Hücre içinde hidroksil radikali, singlet oksijen veya iyonize radyasyon kaynaklı gerçekleşen reaksiyonlar sonucu DNA üzerinde çok çeşitli hasarlanmış baz türevleri oluşmaktadır. DNA'daki bu çeşitli ürünleri tanımlamak ve ölçmek için birçok analitik teknik kullanılmaktadır. Bu amaçla immünokimyasal teknikler, Comet testi, postlabeling ölçüm teknikleri, alkali elüsyon kullanan DNA onarım enzimleri, ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi, elektrokimyasal dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (ECD-HPLC) gibi çeşitli teknikler ve yöntemler kullanılmıştır. Fakat bu tekniklerin pozitif analit tanımlaması için yapısal kanıt sağlamadığı ve hasarlı DNA'daki tek bir ürünü ölçtüğü rapor edilmiştir (Dizdaroğlu vd., 2015). Bazı teknikler yalnızca bir hasar ürününü ölçülebilirken, kütle spektrometresinin kullanıldığı metodlar hem tanımlama hem de oluşan baz hasar ürünlerinin miktar tayinini yapılabilmektedir. Hasar sonucu 20'den fazla hasarlı DNA ürünleri oluşmaktadır. Bunlardan sadece 8-OH-2′dG kütle spektrometresi (MS) ile ölçülebilmektedir (Dizdaroğlu vd., 2002).

Son zamanlarda, GC-MS/MS, LC-MS, ELISA yöntemleri de kullanılmaktadır. İmmünolojik saptama, ^{32}P-postlabelling ve LC-MS-MS, DNA'da 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin ölçümüne alternatif yöntemlerdir, fakat doz yanıtının kesinliği ve tespiti nedeniyle tavsiye edilememektedir (Collins, 2000).

Hücrelerde ve dokularda birçok pirimidin ve pürin lezyonu tespit edilmiş ve miktarları belirlenmiştir (Atmaca ve Aksoy, 2009; Aybastıer vd., 2018b; De Martinis ve De Lourdes Pires

Bianchi, 2002; Dizdaroğlu vd., 2015). Tek hücre jel elektroforezi (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Dinçer ve Kankaya, 2010) ve immunofleurasans (akış sitometri) yöntemleri ise in vivo DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir (Milner, Vaughan ve Clark, 1987; Potter vd., 2002). In vivo olarak yapılan bir çalışmada, deneysel diabet yapılmış sıçanlarda zeytin yaprağı ekstraktının hipoglisemik, antioksidan, karaciğer koruyucu ve oksidatif DNA hasarına karşı etkileri araştırılmış ve sıçan serumlarında 8OH-2dG miktarları ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Temiz, 2016). Mononükleer monositlerde DNA oksidatif hasarına karşı çörekotu sulu ekstresinin etkisi Comet testi ile değerlendirilmiştir (Yüksek, 2011).

Okside olmuş bazı pürin bazlarının elektrokimyasal olarak da hassasiyetle tespit edilebileceğini gösterilmiştir (Yokuş ve Çakır, 2002). Oksidatif hasar oluşturulmuş buzağı timus DNA'sının hasarlı bazları GC-MS/MS ile tayin edilmiş ve hasarlı DNA üzerine üzüm çekirdeği metanol ekstraktının koruyucu etkisi incelenmiştir (Aybastıer vd., 2018a). Hasarlı DNA'da enzimatik hidroliz kullanılarak LC/IDMS-SIM ile ölçülen 8-OH-2dGua ve formik asit ile hidroliz veya Fpg proteini ile hidroliz kullanılarak GC/IDMS-SIM ile ölçülen 8-OH-Gua seviyeleri hemen hemen aynı olduğundan dolayı, benzer sonuçlar verebilmektedir (Dizdaroğlu, Jaruga ve Rodriguez, 2001).

Negatif ve pozitif iyon LC-MS/MS metodunun 8-OH-2dG ve diğer modifiye edilmiş DNA nükleozitlerinin ölçümü için kullanılabilirliği bildirilmiştir (Dizdaroğlu vd, 2015; Skała vd., 2016). LC–MS/MS, tarihsel olarak analitik yöntemler olan GC-MS ve GC-MS/MS'den daha yeni bir alternatif tekniktir. GC tabanlı teknikler, bileşikleri GC kolonlarından ayrıştırmak için öncellikle bu bileşikleri yeterince uçucu hale getirmeli ve bunun için bir kimyasal türevlendirme adımı içermelidir. LC-MS/MS analizi için analitlerin çoğu, önceden türevlendirmeye gerek kalmadan bileşikleri kolondan ayrıştırır. Böylece LC-MS/MS'de numune hazırlama süreci basitleştirildiğinden dolayı, numune verimi artar. LC-MS/MS yöntemleri, özellikle duyarlılık ve özgüllük konusunda genellikle floresan, UV-VIS spektroskopisi veya antikor bazlı yöntemlerden daha iyidir. Ayrıca GC-MS veya GC-MS/MS yöntemlerine göre daha hızlıdır ve numune hazırlamada daha az vakit ve işgücü gerektirir (Winnik ve Kitchin, 2008).

2.6. DNA Onarımı

Genomik DNA sürekli X ışınları, çevresel ajanlar ve UV ışınları tarafından tehdit altında kalmaktadır. Serbest radikaller, dış faktörler dışında en sık DNA hasarı oluşturan endojen faktörler olarak bilinmektedir. DNA hasar örneği olarak tek ve çift DNA zincir kırıkları, abazik alanlar, DNA ve protein arası çapraz bağ oluşumu gösterilebilir. Onarılmamış DNA hasarları hastalıklara ve kansere yol açmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA molekülü dinamik bir yapıya sahip olduğu için onarıma uygun bir biyomoleküldür (Onur vd., 2009). DNA hasarına yanıt olarak hücrelerde DNA onarımı, DNA hasarı kontrol noktası, transkripsiyonel cevap ve programlı hücre ölümü mekanizmaları bulunmaktadır (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015; Sancar vd., 2004). Genomik DNA'nın hasar sonrası gelişen onarım mekanizması, oluşan hasarın tipine göre gelişmekte, birçok DNA lezyonunu ortadan kaldırabilmekte ve onarım sonucunda hücre yaşamını devam ettirebilmektedir (Onur vd., 2009). DNA hasarı ortadan kaldıramadığı durumda metabolik süreçleri (örneğin replikasyon ve transkripsiyon gibi) inhibe edebilir ya da mutasyon oluşumuna sebep olabilir (Chatterjee ve Walker, 2017). Bu mekanizmaların anlaşılması potansiyel toksik maruziyetleri değerlendirmeye ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini kontrol etmek için stratejiler geliştirmeye yardımcı olabilmektedir. Genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarının onarılamaması, genomik kararsızlığa yol açmaktadır ve kanser, erken yaşlanma, immün yetmezlik ve nörolojik anormallikler gibi hastalıkların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu zararlardan korunmak için, hücreler DNA onarım mekanizmalarını kullanmaktadırlar.

DNA onarımı 1) DNA hasarına neden olan kimyasal reaksiyonların doğrudan yerinde düzeltilmesi (direkt onarım) ve 2) Hasara uğrayan DNA bazlarının ortadan kaldırılması ve yeniden sentezlenmiş olan bazlar ile değiştirilmesi şeklinde iki temel mekanizma üzerinden yürüyebilir. Direkt onarım belirli DNA hasar türlerini onarmada fayda sağlayan bir onarım yolu olsa da, eksizyon onarımı DNA'daki birçok kimyasal değişiklikleri onarmada etkili olan daha genel bir DNA tamir mekanizmasıdır (Cooper, 2000).

Çizelge 2.3. DNA hasarı ve onarım yolları (Sancar vd., 2004; Onur vd., 2009)

DNA'ya zarar veren ajanlar	Hasarlı DNA	DNA onarım yolları
Oksijen radikalleri	Tek zincir kırılması	Tek zincir kırılma onarımı
Toksinler	Çift zincir kırılması	Çift zincir kırılma onarımı
X ışınları	Katkı maddeleri	Baz eksizyon onarımı
UV ışığı	İplik içi ve sarmallar arası çapraz bağlanmalar	Nükleotid eksizyon onarımı
Replikasyon hataları	Lezyonlar	Sarmallar arası çapraz bağların onarımı
Anti tümör ajanları (Cis-Pt)	Abazik bölgeler	Translasyon sentezi
Alkilleyici ajanlar	Baz uyumsuzlukları	Yanlış eşleşme tamiri
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar		Rekombinasyon tamiri
		Doğrudan onarım

DNA onarım yolları hem nükleer DNA (nDNA) onarımı hem de mitokondriyal DNA (mtDNA) onarımında rol oynamaktadır. Nükleer DNA onarım yolları doğrudan tersine çevirme (direct reversal), baz eksizyon onarımı (BER), nükleotid eksizyon onarımı (NER), hatalı DNA eşleşme onarımı (MMR), rekombinasyonel onarımı ve hataya meyilli bir tamir sistemi olan translezyon sentezi (TLS) (Li, Guan, Chen, Yang ve Cheng, 2021) olarak ayırılır.

Oksidatif DNA hasarının baz eksizyon onarımı (BER), DNA sarmalındaki oksidatif, alkilasyon, deaminasyon ve abazik tek tek nükleotid lezyonlarını düzeltir. Hücre çekirdeğinde, bu onarım süreci hücre döngüsünün G1 fazı sırasında aktiftir (Chatterjee ve Walker, 2017). Eksizyon onarımının bir türü olan baz eksizyon onarımı oksijen radikalleri, X ışınları ve alkilleyici ajanların neden olduğu baz hasarının onarımında önemli role sahiptir (Cooper, 2000; Goode, Ulrich ve Potter, 2002). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin DNA onarım mekanizması olan eksizyon onarımında, DNA hasarına uğrayan nükleotidler ya da serbest bazlar çıkarılıp, oluşan boşluklar hasarsız olan yeni DNA ipliğine göre sentez ile tamamlanır (Cooper, 2000).

Nükleotid eksizyon onarımı (NER), yapısal ve kimyasal olarak sarmalı bozan DNA lezyonlarının ortadan kaldırılmasından sorumlu çok yönlü bir onarım yoludur (Rahimian vd.,

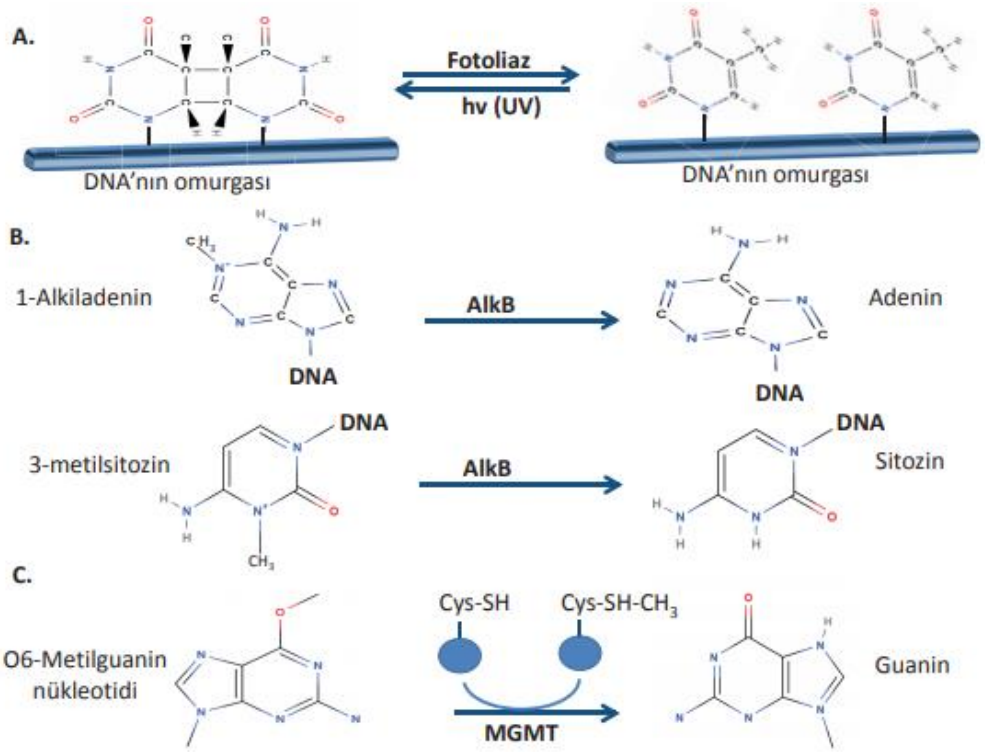
2020). NER'nin global genom NER (GG-NER) ve transkripsiyona kenetlenmiş NER (TC-NER) olarak iki ana çeşidi vardır. GG-NER, genomik DNA hasarını tespit edip ortadan kaldırırken, TC-NER aktif olarak eksprese edilen genleri onarır (Kavaklı, Bulut ve Tardu, 2018).

Hatalı DNA eşleşme onarım (MMR) yolunun en önemli rolü, bazlar arası uyumsuzlukları ve ekleme/silme döngülerini onarmaktır (Li, 2008). Bu, DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tarafından eklenen kusurlu nükleotitleri düzelten temel onarım mekanizmasıdır. Replikasyondan sonra, yanlış sentezlenmiş nükleotitler, yeni kopyalanan DNA zincirinden çıkarılır ve DNA'nın uyumsuz bölgeleri onarılır. Kalıcı DNA hasarını önlemek için diğer hasarsız komplementer DNA zincirleri kullanılarak bu bölge yeniden sentezlenir (Kavaklı vd., 2018).

Rekombinasyonel onarım esas olarak DNA çift sarmal kopmalarında etkilidir. Homolog rekombinasyon onarımı (HRR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) olarak ikiye ayrılır (Chatterjee ve Walker, 2017). Homolog rekombinasyon onarımı tüm çift sarmal DNA kırılmalarının onarımından sorumlu anahtar mekanizmadır. HRR esas olarak hücre döngüsünün S ve G2 aşamalarında meydana gelir. Bu nedenle, kardeş kromatitlerin geniş homolojisi, hatalı veya eksik bazların yeniden sentezlenmesine izin vermek için bir şablon olarak kullanılır (Kavaklı vd., 2018). Homolog olmayan uç birleştirme ise çift sarmal DNA kırılmalarının onarımındaki en basit ve en hızlı mekanizmadır (Chatterjee ve Walker, 2017). NHEJ, iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu çift sarmallı DNA kırıklarını onaran bir mekanizmadır. NHEJ dizi homolojisinden bağımsız olarak kırık DNA uçlarını doğrudan birleştirerek hücre döngüsü boyunca G0/G1'de özellikle aktiftir. Bu onarım mekanizması, gen ekspresyonu minimal olduğunda G0/G1 fazını destekler (Kavaklı vd., 2018).

Doğrudan tersine çevirme onarım yolu, DNA hasarının türüne spesifiktir ve direk olarak fosfodiester omurgayı kırmadan, hasara uğrayan bazları enzimler yardımıyla onarmaktadır. DNA'da UV ışığı kaynaklı oluşan pirimidin dimerleri, kimyasal ajanlarla alkillenmiş bazlar ve metillenmiş sitozinler oluşabilir. İlk hasar örneği olarak belirtilen siklobütan pirimidin dimerleri, fotoliyaz enzimi tarafından onarılır (Şekil 2.16.A). UV kaynaklı pirimidin dimerlerini onaran bu mekanizma, dimerizasyon reaksiyonunun doğrudan tersine çevrilmesidir. Fotoliyaz enzimi insanlarda bulunmadığından insanda UV ışığından dolayı oluşan hasar, nükleotid ekzisyon

onarım mekanizmasıyla onarılır. Direk onarım mekanizmasının bir diğer örneğinde, alfa-ketoglutarat-bağlı dioksigenaz enzimi (AlkB enzimi), alkillenmiş bazdan metil grubunu uzaklaştırarak hasarı direkt olarak onarmaktadır (Şekil 2.16.B). Guaninin O^6 pozisyonundaki metilasyon olarak bilinen hasar ise, prokaryot ve ökaryotlarda bulunan O^6-metilguanin metil transferaz (MGMT) enzimi sayesinde onarılmaktadır (Şekil 2.16.C) (Kavaklı vd., 2018; Cooper, 2000).



Şekil 2.16. DNA onarım mekanizmalarına örnekler

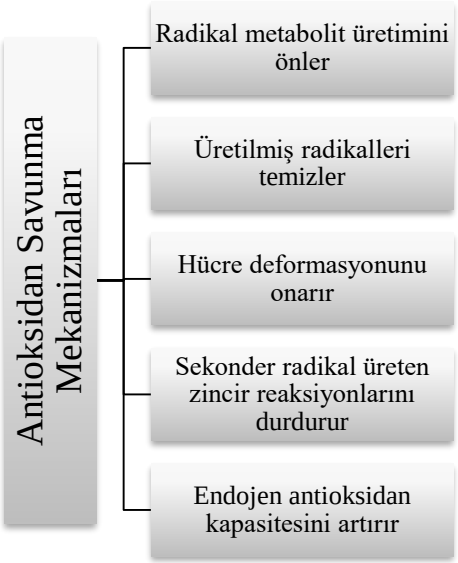
Mitokondrideki elektron taşıma sisteminde biyomoleküllerin işlevini etkileyen mitokondri türevli reaktif oksijen türleri (mROS) üretilmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) bu mROS'lara duyarlıdır ve kolayca oksitlenir. mROS'tan kaynaklanan hasarı azaltmak ve hücrelerin redoks dengesini korumak için mitokondriyal ve sitozolik antioksidan sistemler işbirliği yapmaktadır (Huang, Chen ve Zhang, 2020). Mitokondriyal DNA onarım yolu, mitokondrinin genetik bütünlüğünü ve mitokondriyal DNA'yı oksidatif hasara karşı korumak için, ve de hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için hasarlı DNA'yı onarmaktadır. mtDNA'yı

onarmada kullanılan mekanizmalar da nükleer DNA tamir mekanizmalarına benzer şekilde doğrudan tersine çevirme, BER, MMR, TLS ve çift zincir kopma onarım (DSBR) yollarıdır (Li vd., 2021).

REPAIRtoire veri tabanının çevresel mutasyonlar ve sitotoksik ajanlar ile ilişkili olan tüm DNA lezyonlarının yanı sıra DNA hasarına karşı onarım ve yanıt sırasında meydana gelen tüm modifikasyonları kategorize eden ilk veri tabanı olduğu bildirilmiştir (Milanowska vd., 2011). Son zamanlarda, DNA onarım işlevselliği ile genetik dayanıklılık arasında olan etkileşmenin anlaşılmasını bu veritabanının (http://repairtoire.genesilico.pl) kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

2.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar serbest radikallerin hücrede oluşturduğu oksidatif hasarı önleyen veya geciktiren maddelerdir Antioksidan savunma sistemi farklı mekanizmalar aracılığıyla etkisini göstermektedir (Şekil 2.17). Serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek, onları yakalayarak veya bozulmalarına sebep olarak serbest radikallerin neden olabileceği hücresel ve doku hasarını önlerler (Lobo, Patil, Phatak ve Chandra, 2010). Oksitleyici ajanların neden olduğu hasarı önlemek için antioksidan maddeler onları etkisiz veya inaktif hale getirmek üzere oksidanlara bir proton veya elektron aktarımı yaparlar (Viguie vd., 1993; Yerer ve Aydoğan, 2000).



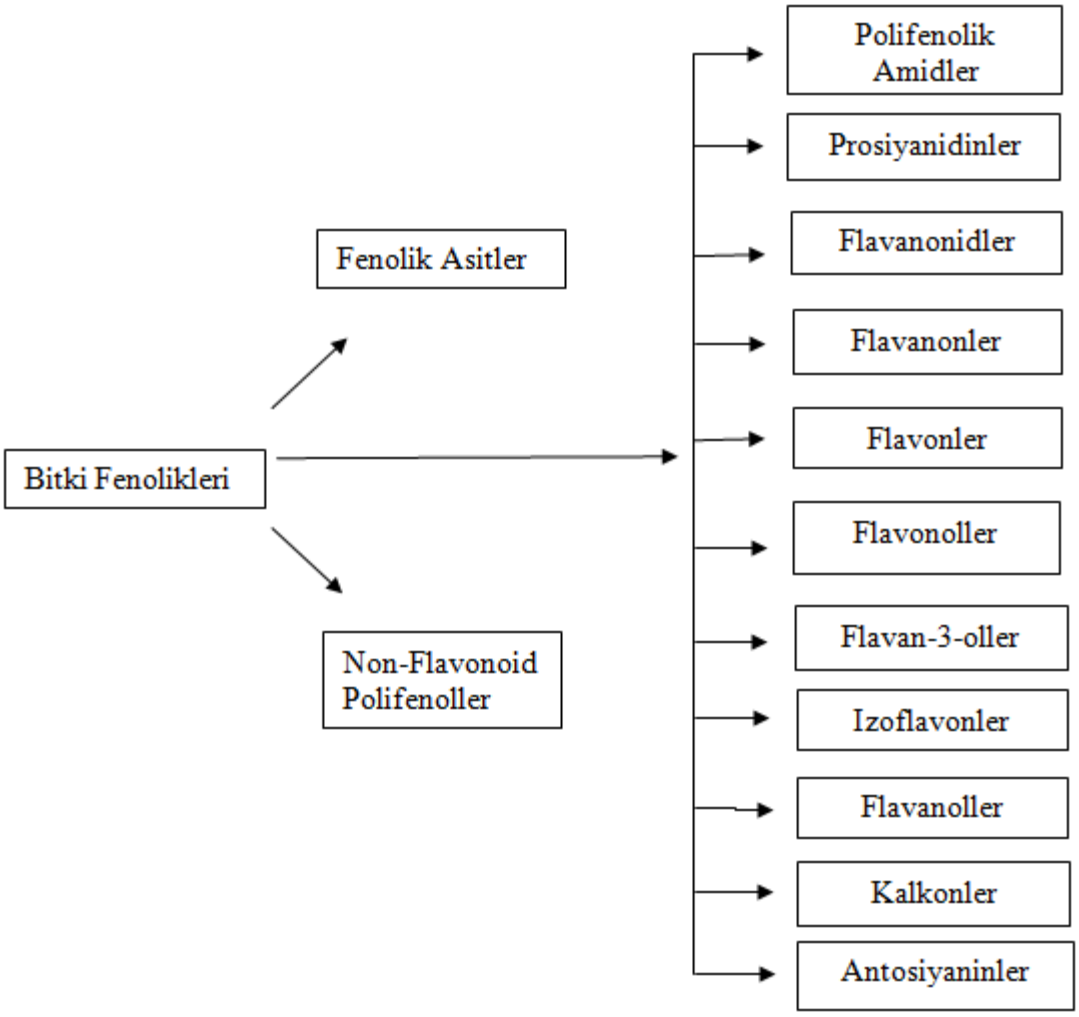
Şekil 2.17. Antioksidan savunma mekanizmaları (Akyüz, 2007)

Antioksidanlar insanlar için endojen ve eksojen kaynaklı olabilir, endojen olanlar metabolizmadaki çeşitli küçük moleküller ve reaktif oksijen türlerini gideren enzimatik sistemlerdir. Bunun yanısıra antioksidan etkili bileşikler beslenme yolu ile alınabilir ve doğrudan metabolizmada etkin olabilirler. Özellikle bitkiler antioksidan bileşenlerin başlıca kaynaklarıdır. Fenolik bileşikler ve flavonoidlerin antioksidan etkilerini, içerdikleri bileşikler sayesinde gösterdikleri bilinmektedir (Kumar ve Pandey, 2013; Panche, Diwan ve Chandra, 2016) ve bu biyolojik etkilerini indirgen ajan, serbest radikal bağlayıcı, singlet oksijen tutucu ve metal şelatlayıcı olma mekanizmaları sayesinde gerçekleştirmektedirler (Güleşci ve Aygül, 2016). Doğal antioksidanlar, insan vücudunda sentezlenen ve dışarıdan besin olarak alınabilen karotenoidler, polifenoller, vitaminler, antioksidan etkili minerallerdir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Bu doğal bileşenlerden Vitamin A, Koenzim Q, askorbik asit, alfa-tokoferol, beta-karotenler, biyoflavonoidler, kükürt içeren bileşikler (Lipoik asit ve glutatyon) gibi moleküllerin antioksidan karakterli oldukları ve serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif hasarı engelledikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Mercan, 2004; Yerer ve Aydoğan, 2000).

2.7.1. Fenolik Bileşikler

Bitkilerin yaprak, dal, meyve, tohum kısımlarında bulunan fenolik maddeler, bitkilerin ikincil metabolizma ürünü olarak bilinmektedir. Bu maddeler sağlık açısından (Carbone, Giannini, Picchi, Lo Scalzo ve Cecchini, 2011) ve gıdaların besleyici kalitesi açısından önem taşımaktadır (Peng, Zhang ve Ye, 2008). Fenolik bileşikler bir aromatik halkaya bağlı fonksiyonel türevlerin yanında bir veya daha fazla hidroksil grubun bulunduran maddelerdir (Kim ve Lee, 2004; Martin, Navas, Jimenez-Moreno ve Asuero, 2017). Bu bileşikler, antioksidan etkilerini serbest radikalleri bağlamak, lipoksijenaz enzimini inhibe etmek veya metaller ile şelat oluşturmak gibi mekanizmalar ile gösterirler (Güleşci ve Aygül, 2016; Nichenametla, Taruscio, Barney ve Exon, 2006).

Polifenolik bileşiklerin temel polifenol grupları fenolik asitler ve flavonoidler (Martin vd., 2017; Robbins, 2003) olup, fenolik bileşikler, yapılarında içerdikleri fenol halkalarının sayısı ve halkaları bağlayacak olan yapı elemanlarına göre sınıflandırılır (Martin vd., 2017) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin sınıfları

Flavonoidler, fenolik maddelerin geniş bir grubunu oluşturan, sebze ve meyvelerin içerdikleri polifenolik antioksidanlardır (Naczk ve Shahidi, 2004; Pawlowska, Oleszek ve Braca, 2008). Bitkilerden izole edilen flavonoidlerin birçok çeşidi vardır, bazıları kateşinler, antosiyanidin, izoflavonlar, flavonollerdir (Chaira vd., 2009; Hertog, Hollman ve Katan, 1992).

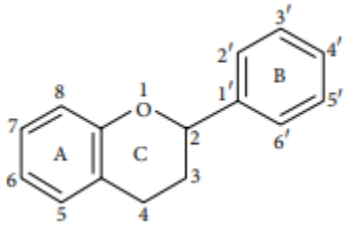
Yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan fenolik bileşiklerden (fenolik asit ve flavonoidler), fenolik asitler sebze ve meyvelerde serbest formda ve düşük miktarda bulunurken (Koca ve Karadeniz, 2005), flavonoidler ikincil bitki fenolikleri olarak, antioksidan aktivite dışında metaller ile şelat oluşturabilme yeteneğindedirler (Heim, Tagliaferro ve Bobilya, 2002). Fenolik bileşikler gıdaların besin kalitesi ile ilişkili olduğu için (Nizamlioğlu ve Nas, 2010)

günlük beslenmede önem taşımaktadırlar. Bitkilerin yapısında doğal olarak bulunurlar ve gıdanın tat, koku ve renk gibi önemli kalite özelliklerinin oluşumunda etkilidirler.

Flavonoidlerin karbon iskeleti, bir propan zincirine bağlı iki fenil halkasından oluşan ve 15 karbon atomu içeren bir difenilpropan (C6 – C3 – C6) yapısıdır (Mülazımoğlu, 2008). A ve B aromatik halkalar, flavan ve flavon yapılarını göstermektedir, C halkası ise hetero halkayı göstermektedir. A halkasında ve C halkasında bulunan karbon atomların numaralandırılması oksijen atomundan başlamaktadır. B halkasında bulunan atomların numaralandırılması, üssü (′) rakamlarla yapılmaktadır (Özyurt, 2005). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2.19'de gösterilmiştir. Flavonoidlerdeki şekerli türevleri sıvı kromotografisi, elektrosprey iyonizasyon (ESI), kütle spektrometrisi gibi farklı yöntemlerle belirlenebilmektedir (Chaira vd., 2009).

Flavonoidler reaktif oksijen türlerini gidermede önemli rol oynarlar (Akoh ve Min, 2008), serbest radikaller tarafından oksitlenip, oksidasyon sonucunda radikalik bileşikler oluşturmaktadırlar. Ancak flavonoidlerin hidroksil grubunun sahip olduğu yüksek reaktivitesi sayesinde oluşturdukları radikaller, reaktif oksijen türü radikallerine göre nispeten daha az reaktiftir. Yüksek radikal temizleyici özelliklere sahip flavonoid türleri arasında öncelikle rutin ve epikateşin yer almaktadır (Nijveldt vd., 2001).

$$\text{Flavonoid-OH} + R^{\bullet} \rightarrow \text{Flavonoid-O}^{\bullet} + RH$$



Şekil 2.19. Flavonoidlerin genel yapısı (Ferreira vd., 2009; Kumar ve Pandey, 2013).

Antioksidan etkili bileşikler sağlık açısından yaşlanmada ve çeşitli hastalıkların önlenmesinde rol oynayan önemli radikal gidericilerdir. Bitkilerin antioksidan etkileri de içerdikleri fenolik bileşiklerden (flavonoidler, kumarinler, sinnamik asit türevleri) kaynaklanmaktadır. Bu sebeple bitkilerin ve içerdikleri ikincil metabolitlerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Sanchez-Gonzales vd. (2019) *Annona cherimola* Mill yaprağının, Butkeviciute vd. (2022) Rosa cinsi meyvelerin içerdigi

avicularin, kersetin, prosiyanidin B1, prosiyanidin B2, kateşin ve epikateşin fenolik bileşiklerinin antioksidan etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, *T. leptophylla* bitkisinin güçlü antioksidan etkiye sahip olduğunu ve yapılan in vivo çalışma sonucunda *T. Leptophylla*'nın metanolik ekstraktının CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı yararlı olabileceği belirtilmiştir (Saeed, Khan ve Shabbir, 2012). Bakar vd. (2019) iskemi/reperfüzyon modeli oluşturdukları sıçanların barsak dokularında naringin'in belirli bir iyileşme sağladığını ve enzimatik antioksidan savunmayı desteklediğini bildirmişlerdir.

Doğal bitkisel antioksidanlar, kanseri önleme ya da azaltma etkisi olduğundan dolayı çeşitli kanser hücre hatları üzerinde çalışılmaktadır. Koyuncu vd. (2018) *Ornithogalum narbonense* L. sürgünlerinin içerdiği kozmosiin fenolik bileşiğinin antikanser etkiye sahip olduğunu belirtilmişlerdir. Hashemzaei vd. (2017) yaptıkları araştırmada, meme kanseri MCF-7 hücreleri, kolon karsinomu CT-26 hücreleri, prostat adenokarsinom LNCaP hücreleri, feokromositoma PC12 hücreleri, insan prostat PC3 hücreleri, akut lenfoblastik lösemi MOLT-4 T hücreleri, yumurtalık kanseri CHO hücreleri, insan miyelom U266B1 hücreleri ve insan lenfoid Raji hücreleri olmak üzere dokuz kanser hücre hattında kersetinin antikanser aktivitesini araştırmış ve araştırılan her hücre hattında kersetinin antikanser etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkilerin içerdigi fenolik bileşikler çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite de göstermektedir. *Barklyanthus salicifolius* (willow ragwort) (Kunth) H. Rob. & Brettell çiçekleri, yaprakları, sapları ve köklerinin içerdiği klorojenik asit, kafeik asit, vanilik asit, gallik asit, ferulik asit, şiringik asit ve p-kumarik asit fenolik bileşiklerinin ve naringenin, kuersetin, phloretin, galangin, mirisetin, rutinklorogenik asit flavonoidlerinin antioksidan ve antifungal etkileri olduğu bildirilmiştir (De vd., 2020). Bir başka çalışmada, *Pseudarthria hookeri* Wight & Arn. (Fabaceae) bitkinin içerdiği psödarflavon A; psödarflavon B; 6,7-(2",2"-dimetilkromano) flavanon; 6-prenilpinosembrin; hiravanon; 6-prenil-3'-metoksieriyodiktiol; boeravinon L; desmoksifilin A; orobol; 6-prenilpinosembrin asetat; 7-benziloksi-6-prenilpinosembrin flavonoidlerinin antibakteriyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Dzoyem vd., 2018). Lim, Kim ve Seo (2007)'nun yaptıkları çalışmada *Impatiens balsamina* L.'den izole edilen kamferol fenolik bileşiğinin, cilt akne problemlere neden olan *P. acnes*'e karşı antibakteriyel ajan olarak etki gösterdiği bildirilmiştir.

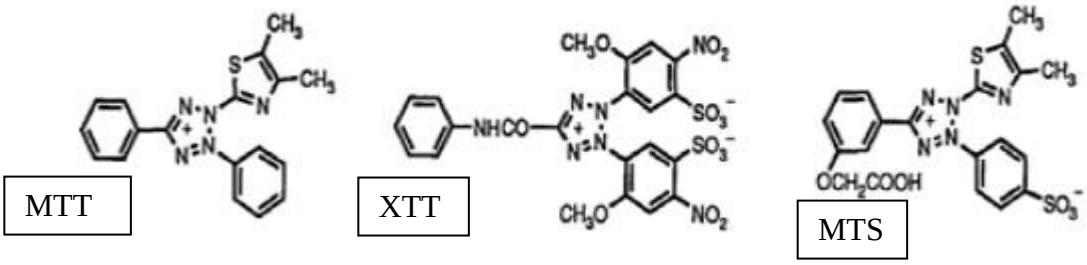
Çay *(Camelia sinensis)* bitkisinin içerdiği epikateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat fenolik bileşiklerinin antidiyabetik etki gösterdikleri bildirilmiştir (Rizvi ve Zaid, 2005).

Ayrıca, antioksidanlar, içerdikleri flavonoidler sayesinde, aterosklerotik inflamasyon sırasında monosit uyumunu modüle ederek kardiyovasküler hastalıkta olumlu etki sağlayabilir (Vermerris ve Nicholson, 2008). *Syzygium cumini* L. çekirdeği ile yapılan bir diğer çalışmada, çekirdeğin içerdiği ellajik asit, şiringik asit, gallik asit, ferulik asit, sinnamik asit ve kersetin fenolik bileşiklerinin kardiyoprotektif etkiye sahip olduğunu belirtilmiştir (Syama vd., 2017).

2.8. MTT testi

MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] testi ilaç potansiyeli taşıyan veya toksisitesi araştırılan maddelerin, ekstrelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürlerinde gerçekleştirilen ölçüm metodlarından biridir. Hücre kültürü, in vitro ortamında spesifik olarak tasarlanan kaplarda, besin, ısı ve nem gibi ortam koşullarının sağlanmasıyla, kontamine olmadan hücrelerin canlılığının sürdürülmesidir. Hücre kültürlerinin tercih edilme nedenleri herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi ve tercih edilen organ veya dokudan alınan hücrelerin kullanılabilirliği ile etik kaygıya yer bırakmamasıdır (Tokur ve Aksoy, 2017; Zucco, De Angelis ve Stammati, 1998). Hücre kültürlerinin sıklıkla tercih edildiği alanlar kanser, ilaç geliştirme, aşı çalışmaları ve in vitro sitotoksisite araştırmalarıdır.

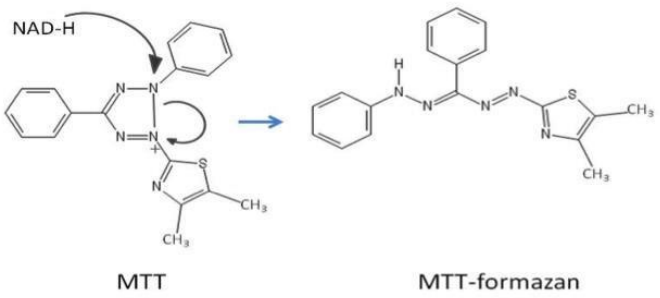
Sitotoksisite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik temelli yöntemlerdir (Fan ve Wood, 2007; Longo-sorbello, Saydam, Banerjee ve Bertıno, 2006). Yapılan sitotoksisite çalışmalarının yöntemi farklı olsa da, amacı çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir. MTT testini de kapsayan tetrazolyum bileşikleri kullanılarak yapılan tetrazolyum boya metodları (MTT, XTT, MTS gibi) farmasötik ajanların, bitki ekstraktlarının veya toksik materyallerin seçilen hücreler üzerindeki sitotoksisitesini (yaşayan hücrelerin kaybı) veya sitostatik aktivitesini (hücrelerin çoğalma halinden durgun/uyku haline geçmesi) belirlemek için kullanılmaktadır (Terzioğlu, Keskin ve Demirel, 2013). MTT testi hücrenin metabolik aktivitesini tayin etmede kullanılan kolorimetrik bir metoddur (Zerbinati vd., 2018).



Şekil 2.20. Tetrazolyum bileşiklerinin kimyasal yapıları (Barltrop vd., 1991).

MTT testinin prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkli tetrazolyum (MTT tetrazolyum; 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) çözeltisinin mor renkte formazana dönüşümü sonucu görülen renk değişiminin mikroplaka okuyucusu veya spektrofotometre ile absorbansının ölçülmesidir (Riss ve Moravec, 2004; Tokur ve Aksoy, 2017). Ölçüm sonucunda meydana gelen sinyal miktarı, tetrazolyum tuz konsantrasyonu, hücre tipi, metabolik kapasite ve canlı hücre sayısı, ortam içeriği, ortam pH'sı, plaka veya kuyu yapısı gibi parametrelerle doğrudan ilişkilidir. MTT bileşiği sarıdır, oluşan formazan ise mordur ve suda çözünmez, absorbansı ölçülmeden önce uygun bir çözücüde çözülmesi gerekir.

Bitki ekstraktlarının veya ilaç moleküllerinin hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için, hedeflenen hücre kültürünün proliferasyonu üzerinde çalışılan maddelerin inhibisyonu veya indüksiyonu üzerine analizler gerçekleştirilmektedir. Araştırılan maddelerin hücre ortamına eklenerek inkübasyon sürecinden sonra, sarı renkli tetrazolyum tuzu (MTT çözeltisi) eklendiğinde, canlı hücredeki NAD(P)H-bağımlı hücresel oksidoredüktazlar, uygun şartlarda bu boyayı mor renkli çözünmeyen formazana indirger (Berridge, Herst ve Tan, 2005). Oluşan formazan kristalleri uygun çözücüde çözündükten sonra absorbans okutulur.



Şekil 2.21. MTT'nin formazana dönüşümü (Zerbinati vd., 2018)

Tez çalışmasında MTT testinde kullanılan hücreler karaciğer kökenli AML12 sağlıklı hücre hattı ve Hep3B kanser hücre hattıdır.

AML12 (Alfa fare karaciğer 12, ATCC) hücreleri, epitel morfolojisi ve büyüme özelliği yapışkan olan, 3 aylık, cinsiyeti erkek olan farenin normal karaciğerinden izole edilen hepatositlerdir. 3D hücre kültürü ve toksikoloji araştırma uygulamalarında kullanılan ve hastalık içermeyen hücrelerdir. AML12 hücre hattı, insan TGF-alfa için transgenik bir fareden (CD1 türü, MT42 hattı) alınan hepatositlerden oluşturulmuştur. Bu hücre hattı uygun bir transfeksiyon konakçısıdır ve tümor oluşturmamaktadır.

Hep3B (insan karaciğer kanseri, ATCC) karaciğer kanseri olan 8 yaşındaki siyah bir genç erkeğin karaciğer dokusundan izole edilmiş, epitel morfolojisi sergileyen ve büyüme özelliği yapışkan olan bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, entegre bir hepatit B virüsü genomu içerir. Karsinom, hepatosellüler hastalıklı olan bu hücreler tümorijenikdir. Hep3B hücre hattı 3D hücre kültürü, kanser araştırmaları, bulaşıcı hastalık araştırmaları, cinsel yolla bulaşan hastalık araştırmaları ve toksikoloji uygulamalarında kullanılmaktadır.

2.9. Çalışmada Kullanılan Bitkiler

Bitkiler yaprak, kabuk, kök, meyve, tohumlarında bulunan fenolik, flavonoid, glikozit, alkaloit gibi biyolojik aktif bileşikler sayesinde ilaçların hammaddesi olarak kullanılmakta (Akyüz, 2010; Carbone vd., 2011; Sofowora, Ogunbodede ve Onayade, 2013) ve bu bileşikler sekonder metabolitler (ikincil metabolitler) olarak bilinmektedir. Farklı kimyasal yapılara sahip olan ve genelde bitkilerde değişen oranlarda bulunan ikincil metabolitler antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinojen, antitümoral, antiviral, antidiyabetik aktiviteler gibi çeşitli

biyolojik etkilere sahiptirler. Bu özellikleri dolayısıyla, insanlık tarihinden beri bitkiler beslenmeye ek olarak sağlık için kullanılmaktadır. Günümüzde de dünyanın birçok ülkesinde hastalıkların tedavisinde ilaç hammaddesi olarak kullanılan bitkilerin, sentetik ilaçlara göre daha az yan etki gösterdiği bildirilmiştir (Ballabh ve Chaurasia, 2007; Matic, Stanic, Mihailovic ve Bogojevic, 2016). Sentetik ve jenerik ilaç sektörünün ilerlemesine rağmen, bitkisel kaynaklar hala aday ilaç molekülü kaynağı olarak önemini korumaktadır ve halkarasında bitkilerden hazırlanan geleneksel halk ilacı uygulamaları da devam etmektedir. Son yıllarda doğal kaynakların daha dikkatli kullanılması gerekliliği ve geri dönüşümün önem kazanmasından dolayı bitkilerle ilgili yapılan çalışmalarda da bu yönde bir eğilim oluşarak, doğal veya endüstriyel atık olan bitkisel kaynaklar biyolojik aktivite yönünden araştırılmaktadır.

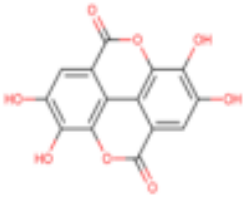
Hasat veya işleme sonrası kalan kabuk, yaprak, çekirdek gibi tarımsal atıklar antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteli biyoaktif bileşenleri içermektedir (El-Baroty, Khalil ve Mostafa, 2014; Okumuş vd., 2015). Bu sebeple bitkisel atıklardan güvenilir, yenilebilir, ucuz antioksidanlar ve antimikrobiyal özellikte olan bileşikleri kazanmak mümkündür, bu amaçla çalışmalar yapılmaktadır (Angiolella, Sacchetti ve Efferth, 2018; Dimitrios, 2006; Movileanu, Nunez De Gonzalez, Hafley, Miller ve Keeton, 2013). Meyve ve sebze atıklarından zengin antioksidan kaynağı olan nar suyu, çekirdeği ve kabuğu (Orak, Yağar ve Selen İşbilir, 2012a), zeytin yaprağı (Orak, Selen İşbilir ve Yağar, 2012b), patates kabuğu (Habeebullah vd., 2010), domates kabuğu (Lugasi vd., 2003), üzüm posası ve çekirdeği (Furiga, Lonvaud-Funel ve Badet, 2009), soğan kabuğu (Lee vd., 2014), elma kabuğu (Wolfe, Wu ve Liu, 2003), havuç çiçeği (Kim vd., 2015), sarımsak dişi, kabuğu ve sapı (Tahmas Kahyaoğlu, 2021), kocayemiş ağacının çiçeklerinin (Selen İşbilir, Orak, Yağar ve Ekinci, 2012) potansiyel antioksidan kaynağı olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca gıda maddelerinin kalite özelliklerini ve besin değerlerini koruyarak, depolama süresini uzatmak sebebiyle kullanılan sentetik antioksidanlar karsinojenik ve toksik etki gösterebileceğinden dolayı kullanımları tercih edilmemektedir (Chen, Panya ve Elias, 2010). Sentetik antioksidanlar yerine antioksidan içerikli meyve ve sebze atıkları gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde önem taşımakta olup (El-Baroty vd., 2014; Okumuş vd., 2015), bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında da bitkisel atık olarak değerlendirilebilecek nar kabuğu, tetra bitkisi yaprağı ve zeytin yapraklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2.9.1. Nar

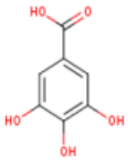
Punicaceae ailesinden olan nar (*Punica granatum*) dünyanın birçok yerinde tüketilen bir meyvedir. Narın kabuğu derimsidir ve koyu pembe, kırmızı veya sarı renklerde olabilir (Tunç, Konca ve Hoş, 2013). Nar ağacının kök kabuklarında %3, gövde kabuklarında ise %0.35-0.60 alkaloid bulunurken, meyve kabuklarında alkaloid bulunmamaktadır (Özkal ve Dinç, 1993). Nar kabuğunda daha çok polifenolik bileşikler bulunmaktadır. Bunlar punicalin, punicalajin, ellajik asit, gallik asit, ellajitanenler (Ramezanian ve Erkan, 2018), kateşin, antosiyaninler ve bazı diğer kompleks flavonoidlerdir (Ambigaipalan, Camargo ve Shahidi, 2016; Bassiri-Jahromi ve Doostkam, 2019). Ayrıca, pelargonidin-3,5-diglukozit ve pelargonidin-3-glukozit sadece nar tanelerinde az bulunurken, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3,5-diglukozit nar taneleri dışında, nar kabuklarında da bulunmaktadır (Özkal ve Dinç, 1993).



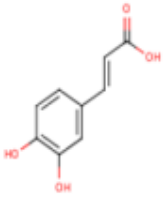
Şekil 2.22. Deneyde kullanılan Hicaz türü nar meyvesi ve kabukları



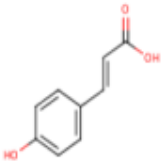
Ellajik asit
(Hidroksibenzoik Asit)



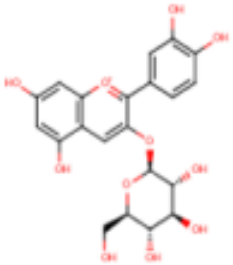
Gallik asit
(Hidroksibenzoik Asit)



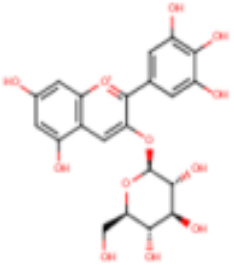
Kafeik asit
(Hidroksisinamik Asit)



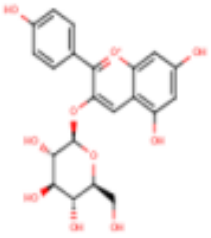
p-Kumarik asit
(Hidroksisinamik Asit)



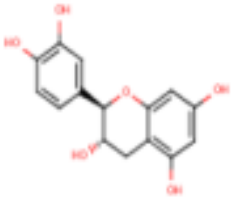
Siyanidin-3-O-glikozit
(Antosiyanin)



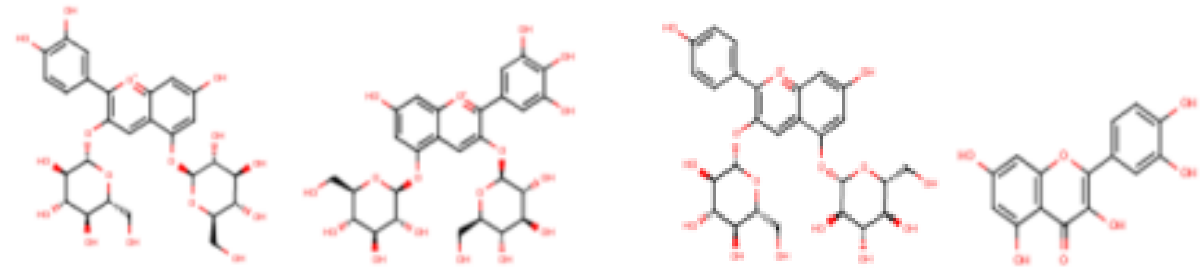
Delfinidin-3-O-glikozit
(Antosiyanin)



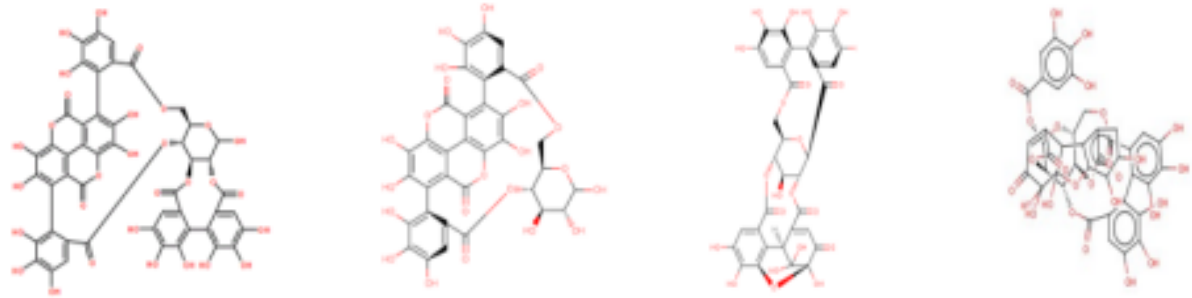
Pelargonidin-3-O-glikozit
(Antosiyanin)



Kateşin
(Flavanol)



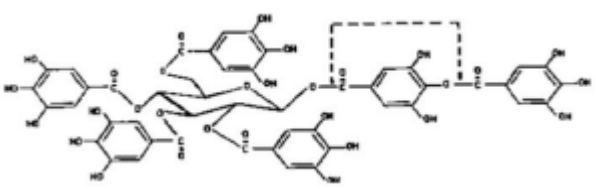
Siyanidin 3,5-O-diglikozit (Antosiyanin) | Delfinidin 3,5-O-diglikozit (Antosiyanin) | Pelargonidin 3,5-O-diglikozit (Antosiyanin) | Kuersetin (Flavonol)



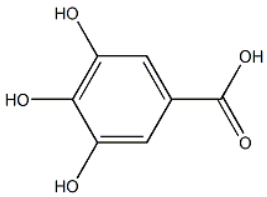
Punikalajin (Elajitanen) | Punikalin (Elajitanen) | Granatin A (Elajitanen) | Granatin B (Elajitanen)

Şekil 2.23. Nar kabuğunun içerdiği fenolik bileşikler ve kimyasal yapıları

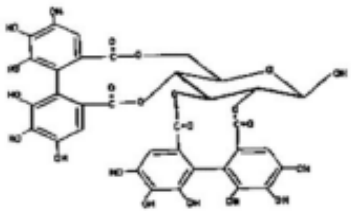
Narın kabuğu, diğer kısımlarına göre daha çok fenolik bileşik içermektedir. Nar kabuğunda en çok bulunan fenolik bileşikler arasında tanenler ve kondanse tanenler yer almaktadır. Bu fenolik bileşikler sıcak su, zayif asit ve baz ya da tannaz enzimi sayesinde fenolik asitler ve karbonhidrata hidroliz olurlar. Tanenlerin merkezinde bulunan karbonhidratın hidroksil (-OH) grupları ile fenolik gruplar ester oluşturmuş durumdadır. Gallotanenler hidroliz sonrası gallik asit oluştururken, elajitanenler ellajik asit meydana getirmektedir. Kondanse tanenler ise flavan-3-oller veya kateşinlerden ve flavan-3,4-di-ol veya lökoantosiyanidinlerden oluşmaktadır. Bunlar hidrolize olmazlar fakat ısıtılarak asidik ortamda antosiyanidinlere dönüşürler.



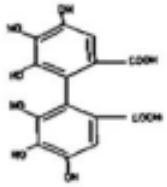
Gallotanen



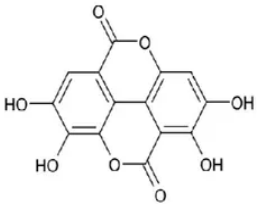
Gallik asit



Elajitanen



Heksahidroksifenik asit



Ellajik asit

Şekil 2.24. Gallotanen ve Elajitanenin hidrolizi

Elajitanenler birden fazla -OH grubu taşımaktadır, bu -OH gruplarında bulunan hidrojenlerini elektronlarıyla birlikte serbest radikallere devrederek onları etkisiz hale getirmektedir. Flavonoidlerde bulunan hidroksil gruplarının sayısı dışında, bu hidroksil gruplarının molekülde bulunan konumları da farklı antioksidan aktiviteye yol açmaktadır (Burda ve Oleszek, 2001). Narın sağlık amaçlı kullanımı önem taşımaktadır, çünkü tüm kısımları içerdiği bileşenleriyle çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir. Yapılan çalışmalarda nar meyvesinin, nar çiçeğinin, nar çekirdeği, nar çekirdeği yağının, nar suyu, nar sirkesi, nar şarabı, nar ekşisi gibi ürünlerin antioksidan etki, koruyucu etki (Özmert Ergin, 2019); nar taneleri, nar suyu, nar çekirdeği ve nar kabuğunun antibakteriyel, antiviral etki (Ramezanian ve Erkan, 2018); nar meyve ve diğer kısımlarının antifungal, antidiabetik etki, kalp sağlığını koruyucu etki (Şimşek ve İkinci, 2017); antikarsenogenik, antihipertansif, farmakolojik aktivite (Bhandari, 2012; Ramezanian ve Erkan, 2018) gösterdiği bildirilmiştir. Fas narı kabuğu, taç yaprakları, çiçekleri ve dalları içerdiği birçok biyoaktif bileşik sayesinde güçlü antioksidan aktivite ve insan kolon kanseri hücre hattı (HT29) ile insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) üzerinde sitotoksik etki göstermektedir (Eddebbagh vd., 2016). Gıda ürünlerinin hazırlanmasından sonra kalan nar kabukları antioksidan etkisi sayesinde sağlık alanında ve farmasötik sektöründe kullanım imkanı bulabilir (Shiban, Al-Otaibi ve Al-zoreky., 2012). Bir başka çalışmada nar

kabuğunda bulunan tanenlerin, nar suyunun antioksidan aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Özmert Ergin, 2019). Nar çiçeği ekstraktının serbest radikallere ve DNA'daki oksidatif hasarlara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Zhang, Yang, Zhang, Wang ve Zhang, 2011).

Zargar ve Pourahmad (2014) çalışmalarında nar meyvesi sulu ekstraktının, etanolik ekstrakttan daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, izole rat hepatositlerinde MTBE'nin neden olduğu sitotoksisiteye, ROS oluşumuna, lipid peroksidasyonuna, GSH tükenmesine, mitokondriyal membran potansiyeli azalmasına ve lizozomal membran hasarına karşı, ellajik asite (120 mM) benzer ölçüde koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Narın antioksidan kapasitesinin birçok meyveninkinden üstün olduğu gösterilmiştir (Karadeniz, Burdurlu, Koca ve Soyer, 2005), ancak narın tüketilme şekli de antioksidan aktiviteyi etkileyen bir faktördür. Bununla birlikte narın duyusal özelliklerinin ve kimyasal içeriğinin yetiştiği bölgeye göre değişiklik gösterebildiği ve antioksidan aktivitelerinin de değiştiği bildirilmiştir (Tehranifar, Zarei, Nemati, Esfandiyari ve Vazifeshenas, 2010; Zhao, Yuan ve Fang, 2013). Karaaslan vd., Türkiye'de yetişen dört farklı nar türü (Hicaz, Hatay, Adana, Antalya) arasında, Hatay'da yetişen narın antioksidan aktivitesinin diğerlerine göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Karaaslan, Vardin, Varlıklıöz ve Yılmaz, 2014).

Punica granatum L. ekstraktının, CCl_4 tarafından indüklenen karaciğer fibrozisine karşı koruyucu etki gösterdiği açıklanmıştır (Wei vd., 2019). Ayrıca, nar kabuğu, meyvesi ve suyunun farklı kanser hücreleri üzerindeki etkisi hakkında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Dikmen vd. (2008) nar kabuğu ekstresinin MCF-7 hücre hatları (insan meme kanseri hücre hatları) üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğunu rapor etmiştir. İnsan PC3 prostat kanser hücresi üzerine yapılan bir diğer çalışmada, nar meyve suyu ekstresinin antiproliferatif ve proapoptotik özelliği olduğu açıklanmıştır (Moga vd., 2021). Meme kanseri hücreleri (Banerjee vd., 2012), HeLa ve REF kanser hücre dizisi (Saad vd., 2010), nazofaringel karsinom hücre dizisi (Hassabou ve Kamel, 2017), SW480, HT29, HCT116, SW620 kolon kanseri hücreleri (Seeram vd., 2005), insan mide kanseri AGS hücreleri (Cheshomi vd., 2022) ve HepG2 hepatom hücreleri (Li vd., 2019) üzerinde sitotoksik etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak *Punica granatum* L.'un Hep2G'den farklılıkları olan Hep3B kanser hücreleri (Qiu vd., 2014; You vd., 2019)

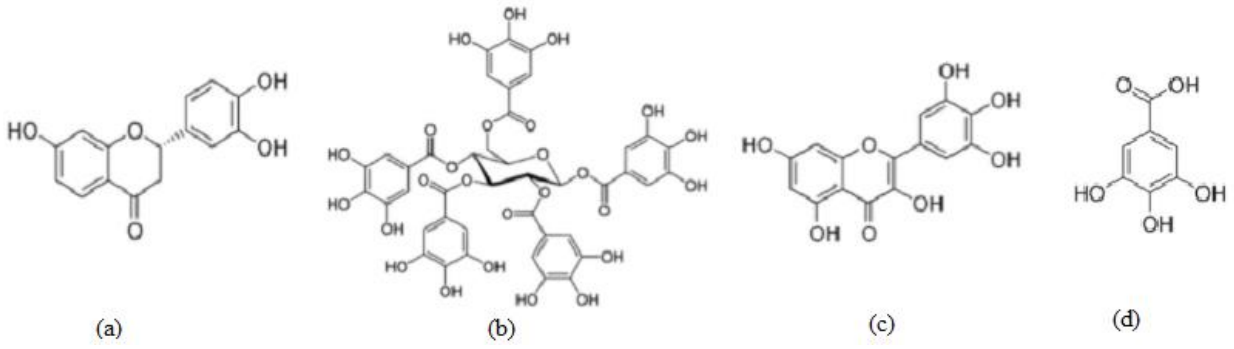
üzerindeki sitotoksik etkisine yönelik herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Hep3B karaciğer kanser hücre hattı ile çalışılmıştır.

2.9.2. Tetra yaprağı

Cotinus coggygria olarak bilinen tetra, duman ağacı, peluke çalışı, rujevina gibi isimlerle de tanınmaktadır Ağustos-Eylül ayları arasında hasat edilmektedir. Tetra yaprakların uzunluğu 2-5 cm civarında, damarları çıkık, dip tarafı tüysüz, alt yüzeyi tüysü, mavimsi yeşil iken, üst yüzeyi yeşil renklidir. Tetra yaprakları flavon ve tanen türleri olmak üzere, dihidroflavonollar, dihidroflavonlar ve auronlar, gallik asit, fisetin, kersetin, metil gallat, mirsetin, sülfüretin, disülfüretin, antosiyaninler (Matic vd., 2013; Wang, Wang, Du ve Li, 2015) gibi fenolik bileşikleri içermektedir.



Şekil 2.25. *Cotinus coggygria* (Tetra) bitkisi (Kaymaz, 2018)



Şekil 2.26. *Cotinus coggygria* bitkisinin farklı kısımlarında bulunan bazı biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapıları; a) 3′,4′,7-trihidroksiflavanon, b) 1,2,3,4,6-penta-O-galloil-β-D-glukoz, c) Mirisetin, d) Gallik Asit (Matic vd., 2016)

Tetra yaprakları antimikrobiyal (Goncagül, Güceyü ve Günaydın, 2020), antiseptik, antihemamorfik, antiinflamatuar, yara iyileştirici (Stanic, Matic, Solujic ve Milosevic, 2009), ateş düşürücü (Huang, 1999), antikanser (Wang vd., 2015) etkili olup, göz rahatsızlıklarında (Li, 2009) kullanılmaktadır. Demirci vd. çalışmalarında tetranın antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, hepatoprotektif, antigenotoksik, yara iyileştirici, duodenal ve gastrik ülserlerde etkisi olduğu bildirmişlerdir (Demirci, Demirci ve Baser, 2003). Rusya'da yetişen *C. Coggygria*'nın kimyasal bileşimi, biyolojik olarak aktif maddeleri ve toksikolojik özellikleri araştırılmış, bitkinin antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Sukhikh vd., 2021).

Bulgaristan'da yetişen *C. coggygria* Scop'un sulu etanolik ekstraktının antiproliferatif etkileri olduğu rapor edilmiştir. Tetra yaprak ekstrenin, A2780 hücrelerine (yumurtalık kanser hücreleri) karşı güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (Gospodinova, Bozsity, Nikolova, Krasteva ve Zupko, 2017). Türkiye'nin Kırklareli ilinde yetişen *C. coggygria*, geleneksel şifalı bitki olarak rapor edilmiştir (Kültür, 2007) ve antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Bektaş, 2011).

2.9.3. Zeytin yaprağı

Olea europaea L. olarak bilinen zeytin ağacı, Oleaceae familyaya aittir. 1956 yıllından beri dünyanın birçok yerinde yetiştirilmekte olup, en çok yayılış gösterdiği bölge Akdeniz ülkeleridir. Yaklaşık 600 türe sahip olan zeytin ağaçları arasında 2000 yıla kadar yaşayabilen türleri vardır (Bıçakçı vd., 2009; Zucco, De Angelis ve Stammati, 1998). Yaklaşık 2-15 m boyuna uzanan, yaprakları her mevsim yeşil ve 8-86 x 4-24 mm boyunda bir ağaçtır (Elgin Cebe, Konyalıoğlu ve Zeybek, 2012). Zeytinin özellikleri, yetiştiği toprak ve bölgeye bağlıdır (Ryan, Antolovich, Prenzler, Robards ve Lavee, 2002). Zeytinin kimyasal bileşimi, olgunlaşma derecesinden etkilenmektedir (Menduh, 2015). İçerdiği fenolik bileşik seviyeleri ve çeşitleri, zeytinin kısımları olan meyve, çekirdek ve yapraklarında değişmektedir (Briante vd., 2002; Ryan vd., 2002).

Zeytin polifenol kaynağı olarak bilinmektedir ve zeytin yaprağında en fazla bulunan fenolik bileşiklerin oleuropein, hidroksitirozol, verbaskozid (Somova, Shode ve Mipando, 2004; Andreadou vd., 2006), apigenin 7-glukozid ve luteloin 7-glukozid olduğu bilinmektedir

(Benavente-Garcia, Castillo, Lorente, Ortuno ve Del Rio, 2000). Bu fenolik bileşikler arasında en yüksek miktarda bulunan oleuropeindir. Oleuropein sekoiridoid grubuna aittir (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006) ve ilk kez 1960 yılında tanımlanmıştır.



(a) **(b)**

Şekil 2.27. Zeytin yaprakları; a) Gemlik türü, b) Domat türü

Zeytinin meyvesi dışında, yaprakları da insan sağlığı açısından önem taşımakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde halk tarafından kullanılmaktadır (Gürbüz ve Öğüt, 2018; Soler-Rivas, Espin ve Wichers, 2000). Zeytin yaprakları, meyveleri ve zeytin tohumlarından özellikle oleuropein ekstrakte edilmektedir. Zeytin yaprağının antioksidan etkisi (Benavente-Garcia vd., 2000; Taamalli, Contreras, Abu-Reidah, Trabelsi ve Youssef, 2019) dışında antimikrobiyal (Bayram, Topuz ve Kaya, 2020; Himour, Yahia ve Belattar, 2017), antihipertansif (Mmopele vd., 2018), antiinflamatuar (Qabaha, AL-Rimawi, Qasem ve Naser, 2018), hipoglisemik, hipolipidemik etkileri (Gürbüz ve Öğüt, 2018; Vogel vd., 2014) bulunmaktadır.

Farklı yaşlarda zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidi yapraklarının toplam fenolik, toplam flavonoid ve oleuropein içeriği arasındaki ilişki incelendiğinde; genç ağaçlarda daha fazla fenolik bileşik ve oleuropein, yaşlı ağaçlarda ise daha yüksek toplam flavonoid miktarı bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, çalışmada yaşlı ve genç ağaçlar arasında toplam fenolik ve oleuropein içeriği açısından pozitif güçlü korelasyon ve toplam flavonoid içeriği ile ilgili pozitif-orta düzeyde korelasyon olduğu belirtilmiştir (Çetinkaya ve Kulak, 2016).

Yıldız ve Uylaşer (2011) zeytin yapraklarında oleuropeinin oranın %1-14 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Al-Azzawie ve Alhamdani (2006) alloksan ile diyabetik yapılmış tavşanlarla yaptıkları çalışmada zeytin yapraklarından elde ettikleri oleuropeinin oksidatif stresi inhibe etme potansiyeline sahip olduğu ve oksidatif stresin meydana getirdiği komplikasyonları

önlemede faydalı olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca oleuropein ve hidroksitirozolun DNA ve lipid oksidasyonu üzerine sentetik ve doğal antioksidanlara göre, daha yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Jalarama Reddy, Jayathilakan ve Pandey, 2015). Oleuropeinin H_2O_2 tarafından indüklenen sitotoksisiteyi baskıladığı ve MEF hücreleri üzerindeki oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Ha, Goo, Sung ve Shin, 2009).

Zeytin yaprakları zeytin hasadı yapıldıktan sonra doğada kalmakta ve sadece küçük bir kısmı bitki çayı olarak değerlendirilmektedir. Bu sebeple bu çalışmada çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu görülen ve kozmetik, farmasötik endüstrileri için bir potansiyel olabilecek zeytin yaprakları ile çalışılması planlanmıştır. Türkiye'de özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde zeytincilik yapılmakta olup, geniş bir zeytin türü çeşitliliği vardır. Çalışmada bu türlerden en yaygın olarak yetiştirilen ve önceki çalışmalarda antioksidan aktivitesi diğer türlere göre daha yüksek olarak belirlenen (Orak, Selen işbilir ve Yağar, 2012b) Gemlik ve Domat türü zeytin yaprakları kullanılmıştır.

Kurutulmuş zeytin yapraklarının etanol ve ardından destile su ile, iki aşamalı maserasyon ile elde edilen ekstraktında daha yüksek fenolik bileşik ve flavonoid verimi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca HPLC yöntemi ile fenoliklerin çeşitliliği gösterilmiştir (Ghomari vd., 2019).

Bitkilerin yaprak, meyve, kök ve sap gibi bazı organlarında bulunan ve ikincil metabolizmasının bileşikleri olan polifenolikler çeşitli biyolojik işlevlere sahiptirler (Vieito, Fernandes, Velho ve Pires, 2018). Bitkilerdeki bulunan bu fenolik bileşenler, antioksidan özellikleri sayesinde sağlığı geliştirici etkiye sahiptirler (Parr ve Bolwell, 2000). Polifenollerin gıda katkı maddesi olarak kullanılması, farmasötik ve kozmetik sektörleri için potansiyel taşımaları, bu doğal ürünleri dolayısıyla bitkileri daha da önemli hale getirmiştir. Bitkisel materyallerin fitobileşenlerini elde etmede ilk ve en önemli basamak etkin bir ekstraksiyon işlemidir. Bitkilerden fenolik bileşen ekstraksiyonunda en çok kullanılan organik çözücülerle yapılan ekstraksiyonlardır ve ekstraksiyon uygulamaları geleneksel ve modern olarak iki gruba ayrılabilir. Maserasyon, çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel metodlar ucuz ama çok çözücü kullanılan, uzun süren işlemlerdir. Son yıllarda süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga-destekli ekstraksiyon (MAE), ultrasonik-destekli ekstraksiyon (USE) gibi modern teknikler, bu geleneksel yöntemlerin yerini almaktadır (He, Du

ve Xu, 2018; Saifullah, McCullum, McCluskey ve Vuong, 2020). Bu alternatif teknikler hem çözücü kullanımını azaltmakta, hem de ekstraksiyon prosedürünü hızlandırarak zaman ve maliyet kazancı sağlamaktadır.

Bitkilerden antioksidan ve fenolik bileşik eldesi için, özellikle ultrasonik destekli ekstraksiyon (USE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ve geri akış ekstraksiyonu gibi çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır (He vd., 2018; Tranfic Bakic, Pedisic, Zoric, Dragovic-Uzelac ve Nincevic Grassino, 2019; Ismandari vd., 2020) Ultrasonik destekli ekstraksiyon bitkilerden fitokimyasal ekstraksiyonunda basit, ucuz, ekstre verimi ve kalitesi yüksek olan ve yaygın kullanılan bir ekstraksiyon yöntemi olarak bilinmektedir (Saifullah vd., 2020).

Bitkiden içeriğini elde etmek üzere yapılan ilk ekstraksiyon işlemi önemli olduğundan ve ekstraktın verimini etkileyebileceğinden dolayı; bu çalışmada hem çalkalamalı su banyosu kullanılarak hem de ultrasonik su banyosu kullanılarak bitki ekstraktları elde edilmiş, radikal giderme güçleri ve fenolik profilleri karşılaştırıldıktan sonra ultrasonik su banyosundan elde edilen ekstraktlar kullanarak MTT testi ve DNA oksidasyonu önleme deneyleri yapılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma, Merck, Riedel-de-Haen ve Fluka ticari firmalarından satın alınmıştır; Na_2CO_3, $NaNO_2$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, NaOH, $Na_2S_2O_8$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $FeCl_2$, H_2O_2, etanol, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), 2,2′-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan), HCl, Oleuropein, Tirozol, Sülfüretin, Gallik Asit, Kersetin, Rutin, Demir (II) sülfat-7-hidrat, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT). Buzağı timusundan elde edilen liyofilize Type XV deoksiribonükleik asit (DNA), 8-hidroksi-2'-deoksi guanozin (8-OH-2dG), Nükleaz P1 (≥ 200 U/mg protein), Alkali fosfataz (90 U/mg protein) ve Fosfodiesteraz I (≥ 20 U/mg solid) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar; Waring Blender, çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan), ultrasonik su banyosu (Daihan WiseClean, Korea), Spektrofotometre ve Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific), Hassas Terazi (Citizon ve Precisa Xb 220a), Vortex (Whirli Mixerin Fisons), Etüv (Daihan), pH Metre (Wtw 82362 Weilheim), Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, Saf Su Cihazı (Elga Reservoir 401 Model), Evaporatör (Buchi R-200), Buzdolabı (Arçelik, Vestel), Derin Dondurucu -80°C (Wise Cyro Daihan), Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS cihazı, Santrifüj, Mikroplaka (Spl Life Sciences Cell Culture Plate), Kuvarz Küvetler (Iso Lab), Mikro Pipetler (Eppendorf), Balon joje, erlenmayer, mezür, cam petriler, cam tüpler, pensler, şırıngalar, Whatmann No:1 kağıdıdır.

3.1.1. Kullanılan çözeltiler

- 10 mM Fe^{2+} çözeltisi: 0,139 g $FeSO_4.7H_2O$ tartılarak saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- 10 mM H_2O_2 çözeltisi: Stok olarak hazırlanan 200 mM H_2O_2 çözeltisinden 1,25 mL alınıp saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl tamponu (10 mM): 1.2114g Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan) tartılarak saf suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlandı. HCl ile pH=7.2 ve pH=9,0 olan tamponlar hazırlandı.
- 1 mM $ZnSO_4$ çözeltisi: 0,0144 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ tartıldı ve pH=7.2 Tris-HCl tamponunda çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.
- 1 mM $MgSO_4$ çözeltisi: 0,0123 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ tartıldı ve pH=9.0 Tris-HCl tamponunda çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.
- %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 tartıldı ve saf suda çözülerek balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.
- Gallik asit çözeltisi (1 mg/mL): 100 mg gallik asit tartıldı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözelti 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500 µg/mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi.
- Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR): Satın alındığı şekilde direk kullanıldı.
- %5'lik $NaNO_2$ çözeltisi: 1 g $NaNO_2$ tartıldı ve saf suda çözülerek 20 mL'ye tamamlandı.
-%10 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ çözeltisi: 10 g $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ tartıldı ve saf suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- 1 M NaOH çözeltisi: 1g NaOH tartılarak saf suda çözülerek 25 mL'ye tamamlandı.
- Kersetin çözeltisi (1 mg/mL): 100 mg kersetin tartıldı ve etanol ile 100 mL'ye tamamlandı. 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL olacak şekilde etanol ile seyreltildi.
- Rutin çözeltisi (1 mg/mL): 100 mg rutin tartıldı ve etanol ile 100 mL'ye tamamlandı ve 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL olacak şekilde etanol ile seyreltildi.
- BHA çözeltisi (1 mg/mL): 50 mg BHA tartıldı ve etanol ile 50 mL'ye tamamlandı ve 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlara etanol ile seyreltildi.
- BHT çözeltisi (1 mg/mL): 50 mg BHT tartıldı ve etanol ile 50 mL'ye tamamlandı ve 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlara etanol ile seyreltildi.
- 1 mM $DPPH^{\bullet}$ çözeltisi: 0.0985 g DPPH tartılarak balon jojeye konuldu ve etanolde çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Işıktan etkilenmemesi için balon joje alüminyum folyo ile kaplandı.
- 0.1 mM $DPPH^{\bullet}$ çözeltisi: 1 mM DPPH çözeltisinden 10 mL alınarak etanol ile 100 mL'ye tamamlandı.

- 7 mM ABTS çözeltisi: 0,770 g ABTS tartıldı ve balon jojede saf suyla çözülerek 200 mL'ye tamamlandı.
- 2.45 mM $Na_2S_2O_8$ çözeltisi: 0,145 g $Na_2S_2O_8$ tartıldı ve balon jojede saf suyla çözülerek 250 mL'ye tamamlandı.

3.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki örneklerinden narlar Kasım 2019'da Antalya'daki Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (BATEM), zeytin yaprakları İzmir'deki Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nden ve tetra yaprakları Ağustos 2019'da Kırklareli'nin Vize ilçesine bağlı Kızılağaç Köyü'nden temin edildi.

Bitkiler oda koşullarında, direk olarak güneş ışığı almayan, havadar bir ortamda kurutuldu ve Waring blenderde öğütüldü. Örnekler hem geleneksel metodlardan biri olarak bilinen çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon metodu ile hem de modern metodlardan biri olarak bilinen ultrasonik destekli ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edildi. Su banyosunda çalkalama (SBE) ile ekstraksiyon bitki/çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde % 75 (v/v) etanol çözücüsü ile 30°C'de ve 125 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda 2 saat boyunca bekletilerek gerçekleştirildi. Ultrasonik destekli ekstraksiyon (USE) bitki/çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde % 75 (v/v) etanol çözücüsü ile 30°C'de 2 saat süre 296 Watt ve 50 kHz'lik çalışma genliğine sahip olan Daihan WiseClean marka bir ultrasonik su banyosunda gerçekleştirildi. Ekstraksiyonlar sonrasında örnekler süzgeç kağıdından süzüldü ve evapörde 35°C'de çözücüleri uçuruldu. Tüm deneylerde elde edilen ham ekstraktlar kullanıldı. Ekstraktlardan birinin hazırlanma basamakları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



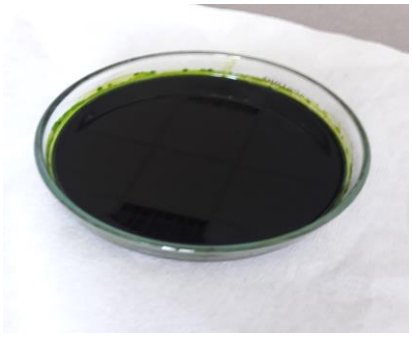
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.1. Ekstrakt hazırlama basamakları: a) Ultrasonik destekli su banyosu ekstraksiyonu, b) Örneklerin süzülmesi, c) Çözücülerin uçurulması, d) Örneklerin kurutulması

3.3. Örneklerin Antioksidan Aktivitesinin Tayini

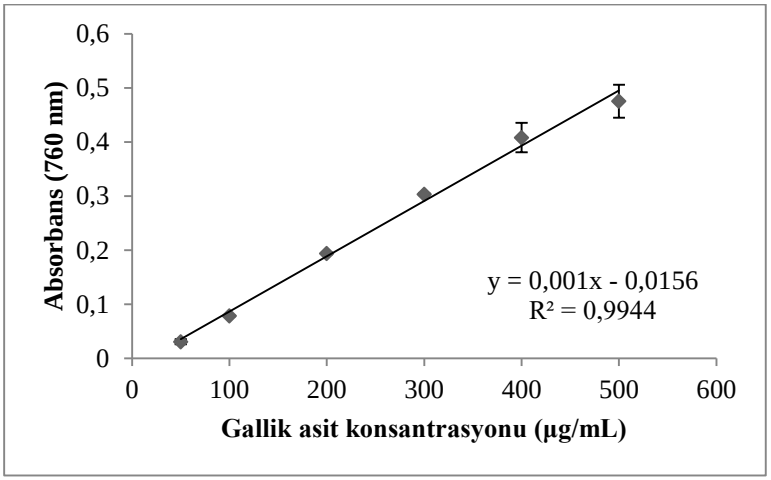
3.3.1. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini Singleton ve Rossi'nin (Singleton ve Rossi, 1965) metoduna göre yapıldı. Folin-Ciocalteu yöntemi elektron transferine dayalı bir yöntem olduğundan dolayı, fenolik içerik olarak ifade edilen indirgeme kapasitesinin de göstergesidir. Bitki ekstraktlarında bulunan polifenoller, spesifik redoks reaktifi (Folin-Ciocalteu reaktifi) ile reaksiyona girerek, 760 nm'de ölçülebilen mavi bir kompleks oluşturur. Yöntemin bitki ekstraktındaki fenolik hidroksil gruplarının toplam konsantrasyonunu ölçmesi için, bir referans madde kullanması gerekir. Farklı fenoller farklı derecelerde reaksiyon verebileceğinden,

sonuçlar genellikle bitkilerde yaygın olarak bulunan gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir (Schofield, Mbugua ve Pell, 2001; Singleton 1999).

Tetra yaprağı, nar kabuğu (Hicaz), zeytin yaprağı (Domat ve Gemlik) örneklerinin 1 mg/mL konsantrasyondaki etanol ekstraktlarından 0.1 mL alındı. Üzerlerine 4.5 mL destile su ve 0.1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi eklendi. Vortekslendikten sonra 3 dk bekletildi. Tüplere 0.3 mL %2'lik Na_2CO_3 eklendikten sonra oda koşullarında 125 rpm'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda beklemeye alındı. Kontrol olarak etanol kullanıldı ve aynı deney prosedürü çalışıldı. Örnek ve kontrol absorbansları λ=760 nm'de ölçüldü.

Standart madde olarak gallik asit (50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL konsantrasyonlarında) kullanıldı ve aynı deney prosedürü uygulandı. Microsoft Excel programında çizilen absorbans-konsantrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemi (y = 0.001x – 0.0156, R^2=0.9944) kullanarak, örneklerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit ekivalenti olarak hesaplandı.



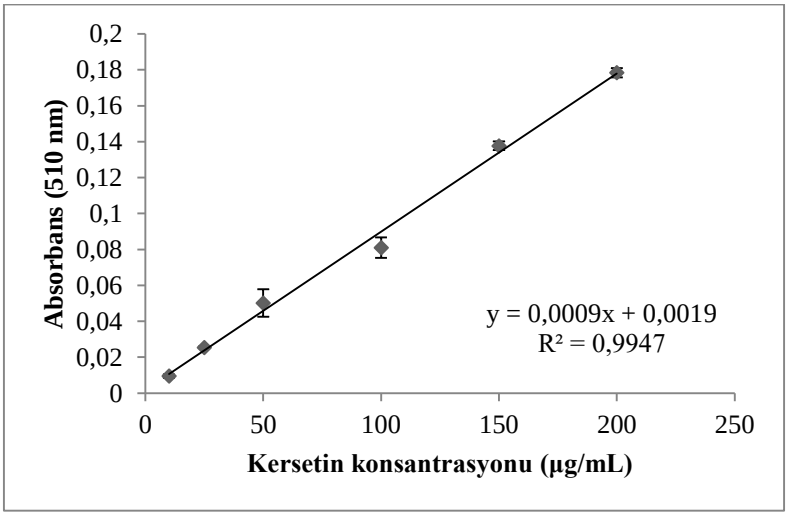
Şekil 3.2. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan Gallik asit standart grafiği

3.3.2. Toplam flavonoid tayini

Toplam flavonoid tayini, flavonoidlerin Al^{3+} ile kompleksleşme reaksiyonu temeline dayanır (Zhishen, Mengchneg ve Jianming, 1999). Alüminyum klorür ($AlCl_3$) ilavesiyle flavonların ve flavonollerin karbonil ve hidroksil grupları arasında sarı bir kompleks oluşur ve

NaOH eklendikten hemen sonra kırmızıya döner ve kompleksin absorbans değeri 510 nm'de ölçülür.

Tetra yaprağı, nar kabuğu (Hicaz türü), zeytin yaprağı (Domat ve Gemlik türleri) örneklerin 1 mg/mL konsantrasyondaki etanol ekstraktlarından 0.5 mL alındı. Üzerlerine 2 mL destile su ve 75 µL % 5'lik $NaNO_2$ çözeltisi eklendi. Vortekslendikten sonra 5 dk oda koşullarında bekletildi. Ardından tüplere 150 µL %10'luk $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ eklendi ve 6 dk oda koşullarında bekletildi. Üzerlerine 0.5 mL 1M NaOH eklenerek vortekslendi. Kontrol olarak etanol kullanıldı ve aynı deney prosedürü çalışıldı. Örnek ve kontrol absorbansları λ=510 nm'de ölçüldü. Standart olarak kersetin (10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL konsantrasyonlarında) kullanıldı ve aynı deney prosedürü uygulandı. Microsoft Excel programında çizilen absorbans-konsantrasyon grafiğinin doğru denklemi (y = 0.0009x – 0.0019, R^2=0.9947) kullanılarak, örneklerin toplam flavonoid miktarları kersetin ekivalenti olarak hesaplandı.



Şekil 3.3. Flavonoid tayini için kullanılan Kersetin standart grafiği

3.3.3. DPPH radikali giderme aktivitesi

Örneklerin serbest radikal süpürme kapasitesi DPPH radikali ($DPPH^{\bullet}$) ve ABTS katyonik radikali ($ABTS^{+\bullet}$) giderme metodları kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlendi. DPPH süpürme aktivitesi Blois'in (Blois, 1958) metoduna göre belirlendi. Çalışmada 10–1000 µg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan ekstraktarın $DPPH^{\bullet}$ süpürme potansiyelini araştırarak

sentetik olan antioksidanlar BHA (bütillenmiş hidroksi anisol) ve BHT (bütillenmiş hidroksi toluen) ile karşılaştırıldı. 1'er mL örnek ekstraktı üzerine 4 mL (0.1 mM) DPPH çözeltisi eklenerek, 30 dakika oda koşullarında karanlıkta bekletildi. Tüm örneklerin absorbansları 517 nm'de okundu. Kontrol tüplere örnek ekstraktı yerine etanol kullanılarak aynı deney prosedürü uygulandı.

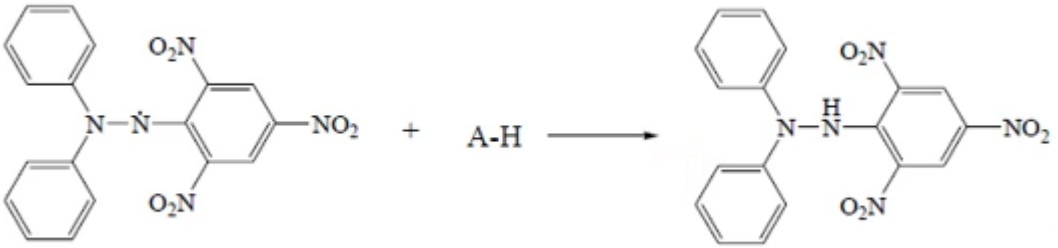
Şekil 3.4'deki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortamda örnekteki antioksidan etkili bileşikler veya standart madde DPPH radikaline bir elektron vererek, radikalin indirgenmesi ve reaktivitesini kaybetmesini sağlar. Bunun sonucunda radikalik çözeltinin mor rengi açılarak sarı renge döner ve bu değişim spektrofotometrik olarak kolaylıkla izlenebilir (Şekil 3.4).

Aşağıda verilen denklem 3.1 kullanılarak örnek ekstraktları ve standart maddelerin serbest radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$\% I = [(A_{Kontrol} - A_{Örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100 \quad (3.1)$$

$A_{Kontrol}$ = kontrol tüpünün absorbansı

$A_{Örnek}$ = örnek veya standartın absorbansı



DPPH• (mor renkli) indirgenmiş DPPH-H (sarı renkli)

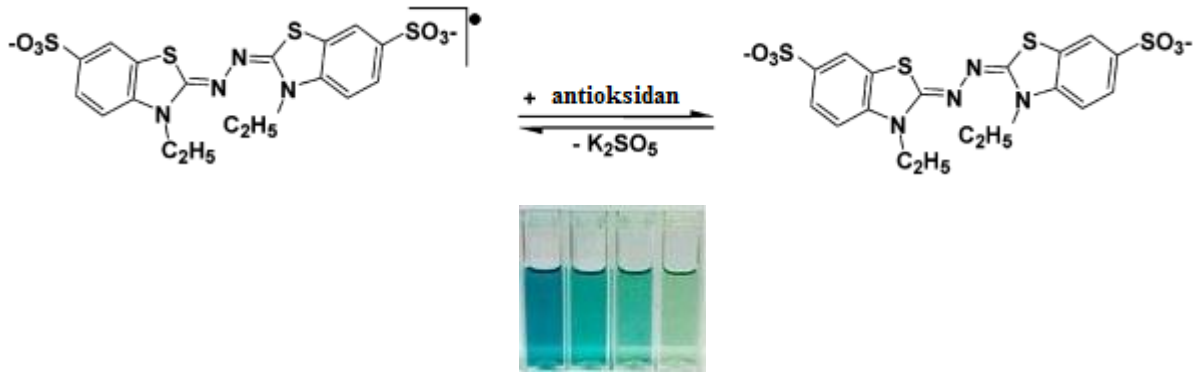


Şekil 3.4. DPPH radikali ile antioksidan molekül (A-H) arasındaki reaksiyon (Molyneux, 2004).

3.3.4. $ABTS^{+\bullet}$ radikali giderme aktivitesi

ABTS giderme metodu kullanılarak da örneklerin serbest radikal süpürme kapasitesi belirlendi. ABTS süpürücü yöntemi, antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çalışmada 10-1000 µg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan ekstraktların $ABTS^{+\bullet}$ süpürme potansiyelini araştırarak sentetik olan antioksidanlar BHA ve BHT ile karşılaştırıldı.

İlk olarak, ABTS çözeltisi ile sodyum persülfat çözeltisi 1:0.5 oranında karıştırılarak 16 saat beklendikten sonra ABTS radikalleri ($ABTS^{+\bullet}$) oluşturuldu. Hazırlanan radikalik çözeltinin 734 nm'deki absorbansı 0.70 olacak şekilde etanol ile seyreltildi. $ABTS^{+\bullet}$ çözeltisi eklenmiş numuneler (100-1000 µg/mL) karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 734 nm'de absorbans ölçüldü (Re vd., 1999). Denklem 3.1'deki formül kullanılarak radikal giderme aktiviteleri hesaplandı.



Şekil 3.5. ABTS radikalinin oluşumu ve antioksidan molekül ile reaksiyonu

Örnek ekstraktlarının serbest radikal giderme sonuçları EC_{50} değeri olarak verildi. EC_{50} (effective concentration) değeri ortamdaki radikallerin yarısını temizlemek için gereken ekstrakt miktarı olarak tanımlanır ve ekstrakt konsantrasyonuna karşı inhibisyon grafiği çizilerek hesaplanır. EC_{50} faktörü, antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için en yaygın kullanılan parametredir. EC_{50} değeri Graphpad 6 kullanılarak hesaplandı.

3.4. Ekstraktların Fenolik Madde Profilinin Analizlenmesi

Bitki ekstraktlarının fenolik bileşen içerikleri LC-MS/MS cihazı ile tayin edildi. Kromatografik ayırma, C8 (150 mm x 3 mm, 3.5 mm) ters fazlı analitik kolonda (Agilent Zorbax SB-C8) gerçekleştirildi. Mobil faz A 5 mM amonyum asetat ve ultra saf sudan

oluşmaktadır, Mobil faz B 5 mM asetonitril:metanol (1:1, v/v) ve %0.1 asetik asitten oluşmaktadır. Numunenin enjeksiyon hacmi 5 µL ve hızı 0.7 mL/dk'dır. LC-MS/MS cihazı, Agilent Technologies 6460 Triple LC/MS sistemi ile kombine ESI iyonizerli kütle spektrometrisi cihazından oluşmaktadır. Cihaz parametreleri iyon püskürtme (IS) voltajı 3500 V; Nebulize edici gaz akışı 10 L/dak, nebulizatör gazı azot ve kaynak sıcaklığı 375 °C'dir. Analizleri ölçmek için çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. LC-MS/MS cihazının çalışma koşulları (Fenolik profil analizi)

Analiz Parametreleri	**Koşullar**
Mobil Faz A	5 mM Ammonium Asetat + Ultra Saf Su
Mobil Faz B	Asetonitril: Metanol (1:1)+ %0.1'lik Asetik Asit
Kolon Sıcaklığı	35°C
Örnekleyici Sıcaklığı	4°C
Kolon	Agilent Zorbax SB-C8 (3.0*150mm 3,5 mikron)
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Analiz Süresi	12.00 dk
Akış Hızı	0.700 mL/dk
İyon Kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Türü	Negatif
Kapiler Voltajı	3500 V
Source Sıcaklığı	375°C
Azot Gaz Sıcaklığı	300°C
Azot Gaz Akışı	10 L/dk
Delta EMV (+)	0 V

Bitki ekstraktları hidrolizlenerek glikozid halinde bulunan maddelerin glikozidik bağının hidrolizlenmesi sonucu örneklerin fenolik madde bileşenleri hidroliz öncesi ve sonrası olmak üzere iki kez ölçüldü.

3.5. Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkinin İncelenmesi

Örneklerin hücrelerin canlılığı üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığını incelemek üzere MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi yapıldı. MTT deneyinde Hep3B ve AML12 hücre hatları kullanılmıştır. Hücrelerin pasajı ve kültüre edilmesi

%5 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM-HAMSF12-EMEM besi yerleri ile 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren steril inkübatörde yapılmıştır. Kültüre alınan bu hücre hatları 10. pasaja kadar çoğaltılmış ve ileride kullanılmaları için dondurma işlemine tabi tutulmuştur, DMSO medyumlu kryotüplerde sıvı azot içinde dondurularak, -150 °C'de depolanmıştır. Çalışmaların tümünde hücre hatlarının 10. pasajlarından başlanmış ve en çok 15. pasajda çalışma sonlandırılmıştır. Bitki ekstraktlarının sağlıklı hücreler (AML12) ve kanser hücreleri (Hep3B) üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla, öncelikle 96-kuyucuklu kültür plakalarında herbir kuyucuk için 10.000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Yaklaşık 24 saatlik uyum süresi sonunda hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda (0.95-1000 ppb) hazırlanan bitki ekstraktları uygulandı ve 24 saat ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. MTT canlılık analizleri doz ve kontrol gruplarından oluşmaktadır. Kontrol grubunda sağlıklı hücrelerde sadece AML12 hücreleri, kanserli hücrelerde sadece Hep3B hücreleri bulunmakta olup, doz gruplarında ise heriki hücre grubuna farklı konsantrasyonlarda ekstraktlar uygulanmıştır.

İnkübasyon sonrası hücre canlılık analizleri MTT çözeltisi kullanılarak yapıldı. Bunun için 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan test solüsyonu (sarı tetrazolyum MTT (3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) 20 µL/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara pipetlendi. Daha sonra plakalar 2 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucukların içindeki besi yerleri tamamen uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200 µL saf DMSO eklenerek ve plakalar Multiskan GO mikroplaka okuyucu ile 492 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Kontrol grubundan elde edilen değer %100 canlılık olarak kabul edilerek, diğer kuyucuklardaki ölüm-canlılık oranları ona göre bağıl olarak belirlendi. Elde edilen verilere IC_{50} değerleri hesaplandı.

$$\%\ \text{Canlılık} = \frac{(\text{Örnek absorbans değeri})}{(\text{Kontrol absorbans değeri})}\ \text{x}\ 100 \qquad (3.2)$$

$$\%\ \text{Ölüm} = 100 - \%\ \text{canlılık oranı} \qquad (3.3)$$

3.6. DNA'da Oksidatif Hasar Oluşturulması ve 8-OH-2dG Ölçümü

Çalışmada antioksidan etkili ekstraktların DNA oksidatif hasarı üzerindeki etkisini incelemek üzere buzağı timus DNA'sı kullanıldı. 5 mg liyofilize DNA tartılarak üzerine 10 mL ultra saf su eklendi ve çözünmüş DNA'nın homojenliğinin sağlanması için bir gece boyunca 4°C'de bekletildi. Daha sonra DNA çözeltisi 1:10 oranında seyreltilerek 4 °C'de 16 saat inkübe edildi. Seyreltilmiş DNA çözeltisinin konsantrasyonunu belirlemek üzere Multiskan Go mikroplaka okuyucu cihazının DNA/RNA (nukleik asit dsDNA) fonksiyonu ile 260 nm'de absorbans ölçüldü. DNA konsantrasyonu cihaz tarafından µg DNA = A_{260} x 50 denklemi kullanılarak hesaplandı. Ayrıca DNA çözeltisinin 260 ve 280 nm'de absorbansları ölçülerek A_{260}/A_{280} oranından saflık derecesi kontrol edildi.

DNA konsantrasyonu hesaplandıktan sonra DNA çözeltisi içeren reaksiyon ortamına H_2O_2 (10 mM) ve Fe^{2+} (10 mM) eklendi ve Fenton reaksiyonu oluşturuldu. Çizelge 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan tüplere bitki ekstraktları eklenerek gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Bitki ekstraktlarının oksidatif DNA hasarını önleyici etkisini incelemek için iki farklı konsantrasyonda (500 µg/mL ve 1000 µg/mL) çalışıldı. Ayrıca tetra yaprağı, Hicaz türü nar kabuğu ve Domat türü zeytin yaprağı ekstraktlarının eşit miktarda karıştırılmasıyla oluşan üçlü Mix ekstraktının etkisi incelendi.

Çizelge 3.2. Fenton reaksiyonu ile DNA'da oksidatif hasar oluşturulma koşulları

DNA	**H_2O_2**	**Fe^{2+}**	**Örnekler**
50 µg	-	-	(Pozitif kontrol)
50 µg	50 µL	25 µL	(Oksidatif hasar kontrolü)
50 µg	50 µL	25 µL	Tetra yaprağı ekstraktı
50 µg	50 µL	25 µL	Domat yaprağı ekstraktı
50 µg	50 µL	25 µL	Gemlik yaprağı ekstraktı
50 µg	50 µL	25 µL	Hicaznar kabuğu ekstraktı
50 µg	50 µL	25 µL	Mix (Tetra+ Hicaz nar+Domat zeytin)

İnkübasyon sonrası DNA, Fenton reaksiyonu ile hasar oluşturulan DNA ve ekstraktların koruyucu gücünün olup olmadığı araştırılan DNA tüpleri üzerine; reaksiyon ortamında 2U Nükleaz P1 (10 mM pH 7.2 Tris-HCl tamponunda), 0.004 U fosfodiesteraz I (10 mM pH 9.0 Tris-HCl tamponunda) ve 16 U alkali fosfataz (10 mM pH 9.0 Tris-HCl tamponunda) olacak

şekilde enzimler ve aktivatörleri (Zn^{2+}/Mg^{2+}) eklendikten sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilerek enzimatik hidroliz uygulandı (Jaruga vd., 2017). Numuneler vakumlu santrifüjde (55°C, 1 saat, 2000 rpm) deriştirildikten sonra vortexlendi ve tekrar santrifüj edildi. Ardından 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS cihazina enjekte edilerek oksidatif hasar göstergesi olan 8-OH-2dG ölçümü yapıldı. Çizelge 3.3'de cihazın çalışma parametreleri verilmektedir.

Çizelge 3.3. LC-MS/MS cihazının çalışma koşulları (8-OH-2dG ölçümü)

Analiz Parametreleri	**Koşullar**
Mobil Faz A	Ultra Saf Su + %0.1'lik Asetik Asit
Mobil Faz B	Metanol + %0.1'lik Asetik Asit
Kolon Sıcaklığı	35°C
Örnekleyici Sıcaklığı	4°C
Kolon	Poroshell EC-C18 (3.0x150mm)3,5 mikron
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Analiz Süresi	11.00 dk
Akış Hızı	0.600 mL/dk
İyon Kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Türü	Pozitif
Kapiler Voltajı	3000 V
Source Sıcaklığı	275°C
Azot Gaz Sıcaklığı	275°C
Azot Gaz Akışı	10 L/dk
Delta EMV (+)	0 V

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Ekstrakt Eldesi

Çalışmada, Hicaz türü nar kabuğu, tetra, Domat ve Gemlik türü zeytin yaprakları için ayrı ayrı iki ekstraksiyon metodu uygulandı. Ultrasonik destekli ve çalkalamalı su banyosu ekstraksiyon tekniklerinden elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Bitkilerden elde edilen ekstraktların yüzde (%) verimleri

Bitki ekstraktları	Kısaltması	Ekstraksiyon verimi (%)
Hicaz türü nar kabuğunun çalkalamalı subanyosundan elde edilen ekstraktı	Hicaz-SBE	41.3
Hicaz türü nar kabuğunun ultrasonik subanyosundan elde edilen ekstraktı	Hicaz-USE	42.3
Tetra yaprağının çalkalamalı subanyosundan elde edilen ekstraktı	Tetra-SBE	22.6
Tetra yaprağının ultrasonik subanyosundan elde edilen ekstraktı	Tetra-USE	21.6
Gemlik türü zeytin yaprağının çalkalamalı subanyosundan elde edilen ekstraktı	Gemlik-SBE	24.9
Gemlik türü zeytin yaprağının ultrasonik subanyosundan elde edilen ekstraktı	Gemlik-USE	29.2
Domat türü zeytin yaprağının çalkalamalı subanyosundan elde edilen ekstraktı	Domat-SBE	18.7
Domat türü zeytin yaprağının ultrasonik subanyosundan elde edilen ekstraktı	Domat-USE	16.5

Ekstraksiyon verimlerinin (g ekstrakt/100 g kuru örnek) çalkalamalı su banyosundan elde edilen ekstraktlar için Hicaz türü nar kabuğunda %41.3, tetra yaprağında %22.6, Domat türü zeytin yaprağında %18.7 ve Gemlik türü zeytin yaprağında %24.9 oranlarında olduğu görüldü.

Ultrasonik destekli (USE) ekstraksiyona ait verimler ise Hicaz türü nar kabuğu için %42.3, tetra yaprağı için %21.6, Domat türü zeytin yaprağı için %16.5 ve Gemlik türü zeytin yaprağı için %29.2 olarak hesaplandı.

4.2. Spektrofotometrik Metod ile TPC ve TFC Miktar Tayini

4.2.1.Toplam fenolik madde tayini

Baharatlar, sebzeler ve meyveler gibi birçok bitkisel kaynağın gösterdiği antioksidan aktivite flavonoid, fenolik asit ve polifenolik bileşikler gibi ikincil metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. Çalışmada örneklerin toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemi ile tayin edildi. Çizelge 4.2'de Hicaz nar kabuğu, tetra yaprağı, Domat zeytin yaprağı ve Gemlik zeytin yaprağından elde edilen ekstraktların içerdiği fitobileşenlerden fenolik madde miktarı verilmiştir. Spektrofotometrik metodla yapılan fenolik madde tayininde, örneklerin içerdiği toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/mg ekstrakt)

Örnek	Toplam Fenolik Madde (µg GAE/mg)
Hicaz-USE	157.3 ±8.202
Hicaz-SBE	168.19 ± 7.226
Tetra-USE	255.69 ± 7.828
Tetra-SBE	222.25 ± 8.436
Domat-USE	108.18 ±5.267
Domat-SBE	62.86 ±8.428
Gemlik-USE	102.06 ±2.489
Gemlik-SBE	106.93 ±2.220

4.2.2. Toplam flavonoid madde tayini

Çalışmada Hicaz türü nar kabuğu, tetra yaprağı, Domat türü zeytin yaprağı ve Gemlik türü zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlarda bulunan flavonoid içerikleri $AlCl_3$ ile kompleks

oluşturma prensibine dayanan spektrofotometrik metod ile belirlendi. Flavonoid miktarları etanol ekstraktlarında kersetin eşdeğeri olarak belirlenmiştir. Örneklerin içerdiği fitobileşenlerden olan flavonoid miktarı sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Toplam flavonoid miktarları (µg KE/mg ekstrakt)

Örnek	Toplam Flavonoid miktari (µg KE/mg)
Hicaz-USE	106.04 ±12.570
Hicaz-SBE	112.36 ±10.852
Tetra-USE	161.56 ±6.090
Tetra-SBE	160.42 ±7.205
Domat-USE	775.41 ±5.940
Domat-SBE	400.015 ±8.153
Gemlik-USE	699.535 ±13.484
Gemlik-SBE	465.44 ±8.060

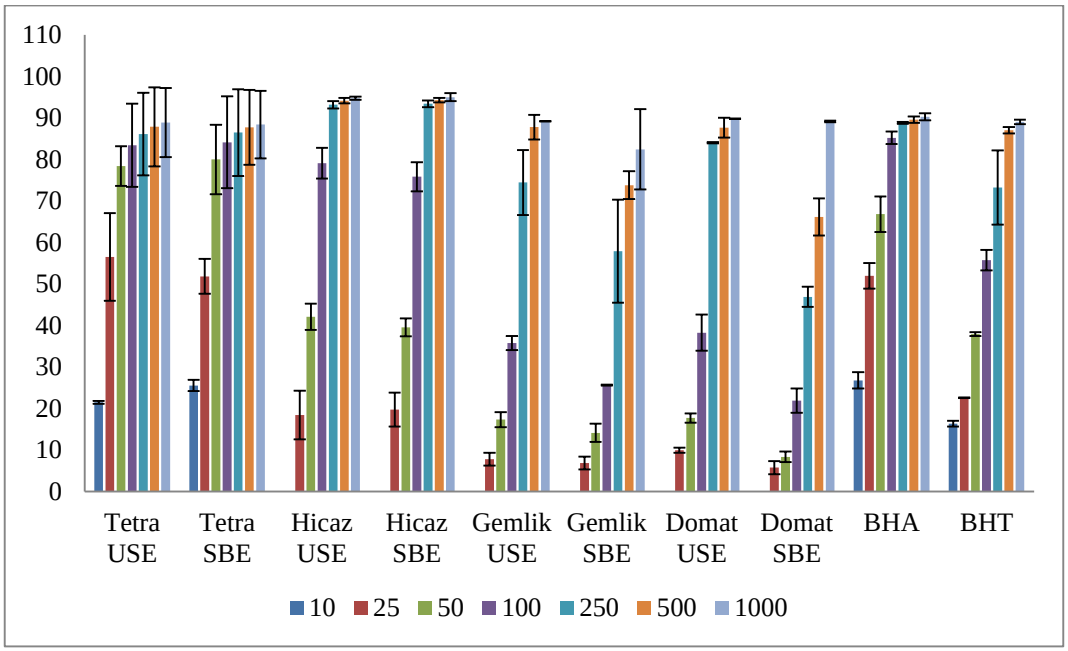
4.3. Antioksidan Aktivite Tayinleri

Çalışmada Hicaz türü nar kabuğu, tetra yaprağı, Domat türü zeytin yaprağı ve Gemlik türü zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlara yaygın kullanılan antioksidan aktivite metodlarından $DPPH^{\bullet}$ giderme ve $ABTS^{+\bullet}$ giderme yöntemi testleri uygulandı. Bu antioksidan aktivite tayin metodları, gıda veya bitki ekstraktlarının içerdiği antioksidan bileşikler tarafından $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{+\bullet}$ radikallerinin nötralize edilmesine dayanan yöntemlerdir.

4.3.1. DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi

Çalışmada 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların DPPH radikalini giderme potansiyelleri incelendi. Standart madde olarak BHT ve BHA sentetik antioksidanları kullanıldı. Örnek ekstraktlarının konsantrasyona bağımlı olarak $DPPH^{\bullet}$ giderme aktivitelerinin arttığı gözlendi. Genel olarak, örneklerin ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların, çalkalamalı su banyosu kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlara göre daha yüksek serbest radikal giderme kapasitesi gösterdiği görüldü (Şekil 4.1). Ayrıca tetra ekstraktlarının ve yüksek konsantrasyonlardaki Hicaz

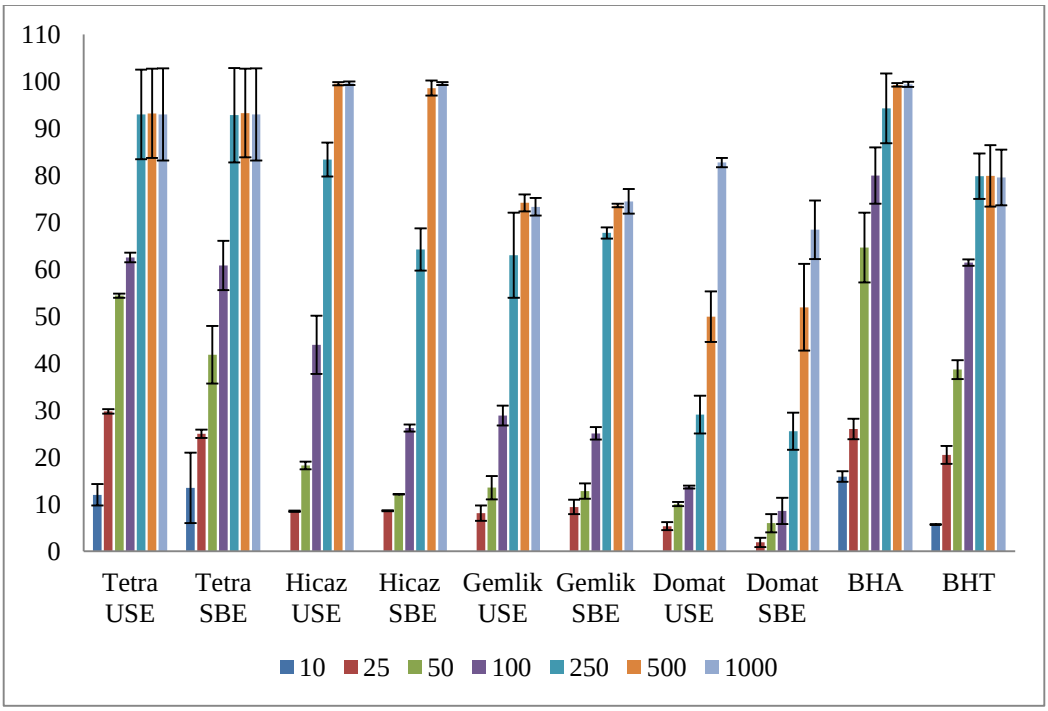
türü nar kabuğu ekstraktlarının standart maddelerle kıyaslanabilecek düzeyde radikal giderdiği belirlendi.



Şekil 4.1. Ekstraktların DPPH radikali giderme güçleri

4.3.2. $ABTS^{+\bullet}$ radikal giderme aktivitesi

Çalışmada 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların $ABTS^{+\bullet}$ giderme potansiyelleri incelendi ve BHT ve BHA gibi sentetik antioksidanlar ile karşılaştırıldı. DPPH metoduna benzer şekilde, ekstraktların konsantrasyona bağımlı olarak ABTS radikal giderme aktivitelerinin arttığı ve genel olarak örneklerin USE ekstraktlarının SBE ekstraktlarına göre daha yüksek radikal giderme kapasitesi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Ekstraktların $ABTS^{+\bullet}$ giderme sonuçları

Çalışmada iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların DPPH ve ABTS radikalleri giderme metodlarındaki EC_{50} değerleri belirlendi. Yüksek EC_{50} değeri örneğin düşük aktivitesi olduğunun göstergesidir. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların DPPH ve ABTS radikalleri giderme EC_{50} değerlerine göre, çalışılan her örneğin ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlarının, çalkalamalı subanyosu yöntemiyle elde edilen ekstraktlarına göre daha yüksek radikal giderme kapasitesi gösterdiği belirlendi. Sadece ABTS radikali giderme yönteminde Domat-SBE'nin EC_{50} değerinin, Domat-USE'nin EC_{50} değerine göre daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca tetra yaprağının radikal giderme etkinliğinin standart maddelerden kıyaslanabilecek güçte olduğu görüldü.

Çizelge 4.4. Serbest radikal giderme metodlarında ekstraktların EC_{50} (µg/mL) değerleri

	EC_{50} değerleri (µg/mL)									
	Tetra USE	***Tetra SBE***	***Hicaz USE***	***Hicaz SBE***	***Gemlik USE***	***Gemlik SBE***	***Domat USE***	***Domat SBE***	***BHA***	***BHT***
DPPH metodu	25.51	28.0	65.12	70.64	129.7	172.9	119.0	252.5	34.76	92.34
ABTS metodu	55.55	71.73	122.9	192.8	133.8	137.3	375.4	309.8	49.33	54.93

EC_{50} değerleri GraphPad Prism 6.0 ile hesaplanmıştır.

İki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlarda, spektrofotometrik yöntem ile yapılan toplam fenolik ve flavonoid tayinleri ve DPPH ve ABTS metodları ile yapılan radikal giderme sonuçlarına göre genel olarak ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların, çalkalamalı su banyosu yöntemiyle elde edilen ekstraktlara göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sebeple ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminden elde edilen ekstraktlar ile çalışmalara devam edilmiştir. Uygulanan ekstraksiyon yöntemine ve ekstraksiyon koşullarına göre bitkilerden elde edilen özütün fitokimyasal içeriğinde ve dolayısıyla göstereceği biyolojik aktivitelerinde değişiklik olabileceğinden dolayı, çalışmanın devamında ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde diğer şartlar aynı tutularak ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimi, toplam fenolik ve flavonoid madde miktari ve antioksidan aktivite üzerine etkisi de araştırılmıştır. Ekstraktın antioksidan kapasitesi önemli ölçüde değişmeden ekstraksiyon süresi kısaltılırsa, bu durumda endüstriyel olarak üretim maliyeti için önemli olan zaman ve enerji tasarrufu sağlanması sözkonusu olabilecektir. Bu amaçla çalışmada Domat türü zeytin yaprağı model olarak alınmış ve 30°C'de, %75'lik etanol çözücüsü kullanılarak, değişik süreler boyunca (15 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk) ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Diğer örneklerde yapılan toplam fenolik madde tayini, DPPH ile ABTS radikal giderme metodları uygulanmıştır. Toplam flavonoid tayininde çalışılan diğer örneklerden farklı olarak standard olarak rutin kullanılmış ve elde edilen standart grafiğin denklemi ($y = 0.0012 + 0.0206$, $R^2 = 0.9996$) kullanılarak, toplam flavonoid miktarları rutin ekivalenti cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5'deki sonuçlara göre 15 dk, 30 dk ve 60 dk sonikasyon sürelerine kıyasla, maksimum ekstraksiyon veriminin 120 dakikalık sonikasyon süresi ile elde edildiği görüldü. Ancak farklı sonikasyon süreleri uygulanan Domat türü zeytin yaprağının etanol ekstraktında,

toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içerikleri arasında ve serbest radikal giderme aktiviteleri arasında statistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı ($p<0.05$) gözlendi.

Çizelge 4.5. Domat zeytin yaprağının ekstraksiyon süresinin TPC, TFC ve radikal giderme aktiviteleri üzerine etkisi

Ekstrakt	Ekstrakt Verimi (%)	Toplam Fenolik madde tayini (µg GAE/mg)	Toplam Flavonoid tayini (µg Rutin/mg)	EC_{50} (mg/mL) DPPH metodu	EC_{50} (mg/mL) ABTS metodu
USE-15	14.2[a]	99.7±0.12[a]	421.3± 0.10[a]	130.3[a]	411.3[a]
USE-30	15.4[a]	97.5±0.03[a]	410.1± 0.04[a]	137.6[a]	376.9[a]
USE-60	19.1[a]	102.7±0.04[a]	418.7±0.02[a]	127.6[a]	409.2[a]
USE-120	19.4[a]	104.5 ±0.018[a]	530.2±0.045[a]	122.8[a]	406.7[a]

USE= Ultrasonik destekli ekstraksiyon
SD = Standart Sapma (n=2)
[a] $p<0.05$ düzeyinde önemli farklılıkları işaret etmektedir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, ekstraksiyon süresi değerlerinin toplam fenolik madde miktarı (TPC), flavonoid miktarı (TFC), DPPH ve ABTS radikal giderme metodları ile anlamlı bir şekilde ilişkili olmadığı görüldü. Ayrıca DPPH ve ABTS EC_{50} değerleri ile ekstraksiyon süresi ($p < 0.05$) arasında bir ilişki görülmedi, bu sonuç 120 dakikalık ultrasonik destekli ekstraksiyon süresi yerine, 15 dakikalık ultrasonik destekli ekstraksiyon süresinin yeterli olabileceğini öngörmektedir.

Çizelge 4.6. Ekstraksiyon süresi ile analiz sonuçları arasındaki ilişki

	Süre	TPC	TFC	DPPH (EC_{50})	ABTS (EC_{50})
Süre p değeri	1	0.135	0.089	0.211	0.096

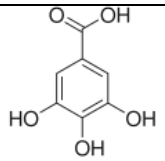
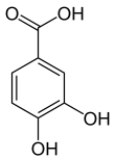
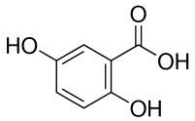
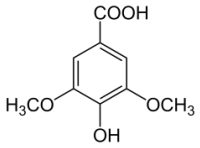
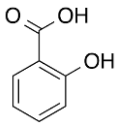
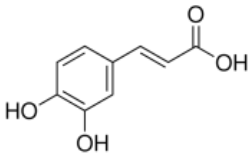
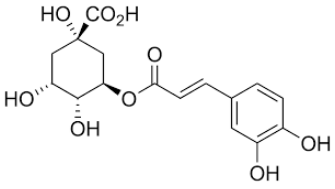
Ekstraksiyon süresi ile analiz sonuçları arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

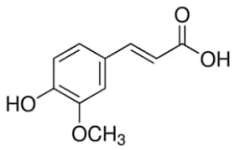
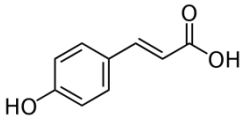
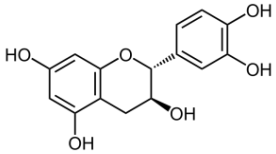
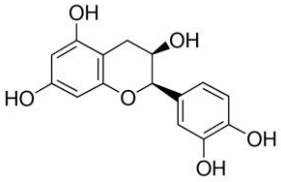
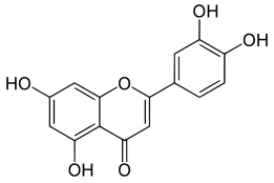
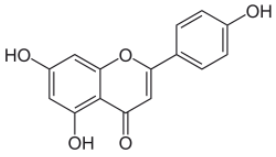
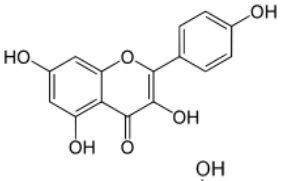
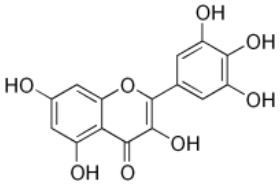
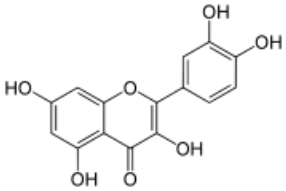
4.4. Örneklerin Fenolik Madde Profilinin LC-MS/MS ile Analizlenmesi

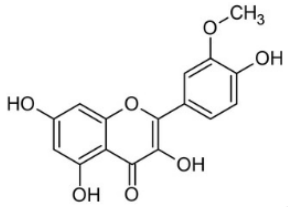
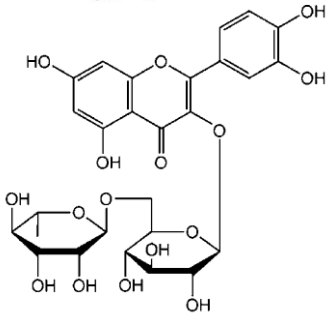
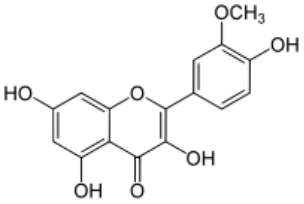
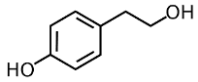
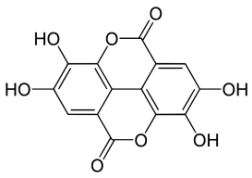
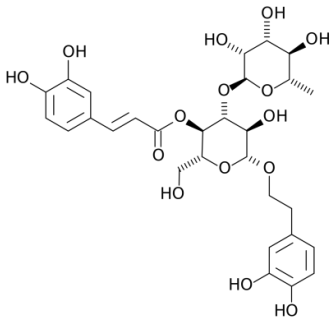
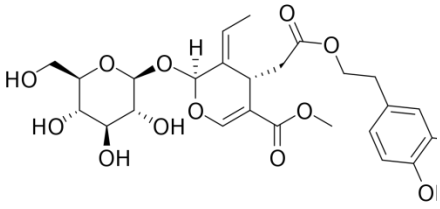
Hicaz türü nar kabuğu, tetra, Domat ve Gemlik türü zeytin yaprağı ekstraktlarında Gallik Asit, Protokateşik Asit, 2,5-Dihidroksibenzoik Asit, Şiringik Asit, Salisilik Asit, Kafeik Asit, Klorojenik Asit, Kateşin, Epikateşin, Giberellik Asit, Tirozol, Verbaskosit, Sinapik Asit, Rutin, 2-Hidroksitranssinnamik Asit, p-Kumarik Asit, Naringin, trans-Ferulik Asit, Etil Gallat, Florizin,

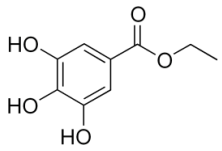
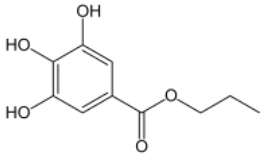
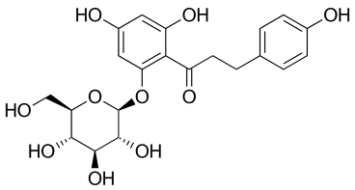
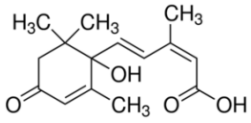
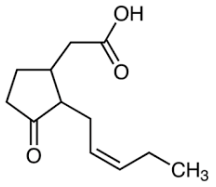
İndole-3-asetik Asit, Oleuropein, Resveratrol, Mirisetin, Ellajik Asit, Propil Gallat, Kersetin, Absisik Asit, Lütolein, Kamferol, İsoramnetin, Jasmonik Asit, Apigenin olmak üzere 33 bileşenin miktarları LC-MS/MS cihazı ile tayin edildi. Herbir örneğin çalkalamalı su banyosu ve ultrasonik destekli ekstraksiyonlarından elde edilen örneklerin fenolik bileşenleri ppb olarak verilmiştir.

Çizelge 4.7. Analiz edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları

Fenolik Bileşiğin Kimyasal Yapısı	Fenolik Bileşiğin Adı	Fenolik Bileşik Grubu
	Gallik Asit	Hidroksi benzoikasit
	Protokateşik Asit	Hidroksi benzoikasit
	2,5-Dihidroksibenzoik asit	Hidroksi benzoikasit
	Şiringik asit	Hidroksi benzoikasit
	Salisilik asit	Hidroksi benzoikasit
	Kafeik Asit	Sinnamik asit
	Klorojenik asit	Sinnamik asit

	Trans ferulik asit	Sinnamik asit
	p-kumarik asit	Sinnamik asit
	Kateşin	Flavanol
	Epikateşin	Flavanol
	Lütolein	Flavon
	Apigenin	Flavon
	Kamferol	Flavonol
	Mirisetin	Flavonol
	Kersetin	Flavonol

	İzoramnetin	Flavonol
	Rutin	Kersetin glikozidi
	İsorhamnetin	O-metil flavonol
	Tirozol	Fenolik bileşik
	Ellajik asit	Fenolik bileşik
	Verbaskozit	Glikozidli fenolik bileşik
	Oleuropein	Glikozidli fenolik bileşik

	Etil gallat	Gallik asidin etil esteri
	Propil gallat	Gallik asidin propil esteri
	Florizin	Dihidrokalkon
	Absisik asit	Seskiterpenoid sınıfı bitki hormonu
	Jasmonik asit	Lipidik bitki hormonu

Analiz edilen Hicaz türü nar kabuğu ekstraktında Gallik Asit, Protokateşik Asit, 2,5-Dihidroksibenzoik Asit, Kateşin, Epikateşin, Rutin, p-Kumarik Asit, Etil Gallat, Florizin, Mirisetin, Ellajik Asit, Kersetin, Absisik Asit, Lütolein, Kamferol, İsoramnetin, Jasmonik Asit ve Apigenin tayin edildi. Her iki ekstraksiyon uygulamasıyla elde edilen ekstraktların fenolik bileşenlerinde miktar farklılığı olmasına rağmen, aynı bileşiklerin olduğu görüldü. En yüksek miktarda Ellajik Asit, Absisik Asit ve Etil Gallat bulundu (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. Çalkalamalı subanyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Hicaz türü nar kabuğu ekstraktının (Hicaz-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Hicaz-SBE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Hicaz-SBE* (ppb)**
Gallik Asit	1.64	168.9/125	402.03	1.67	168.9/125	9235.28
Protokateşik Asit	1.93	153.1/109.1	51.98	1.98	153.1/109.1	350.67
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	17.46	2.14	152.9/107.9	671.27
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Kafeik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Klorojenik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Kateşin	3.91	288.9/245	145.33	3.86	288.9/245	0
Epikateşin	3.90	288.9/245	152.43	3.91	288.9/245	0
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	-	-	ND	-	-	ND
Verbaskosit	-	-	ND	-	-	ND
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.02	609/299.9	62.33	4.09	609/299.9	0
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	4.04	163.1/118.9	179.88	4.02	163.1/118.9	656.23
Naringin	4.36	579.1/271	ND	3.99	579.1/271	ND
trans-Ferulik Asit	4.17	193/134.1	0	4.15	193/134.1	126.34
Etil Gallat	4.18	197/124	536.24	4.21	197/124	500.70
Florizin	4.25	434.8/272.9	471.79	4.27	434.8/272.9	26.98
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	-	-	ND	-	-	ND
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.23	317/150.9	147.84	4.26	317/150.9	1971.90
Ellajik Asit	4.16	300.9/284	873789.84	4.17	300.9/284	963296.94
Propil Gallat	4.30	211/124.1	0	4.27	211/124.1	22.79
Kersetin	4.36	301/150.9	265.21	4.35	301/150.9	511.00
Absisik Asit	4.39	262.9/253	1830.48	4.39	262.9/253	2270.55
Lütolein	4.39	284.9/133	122.84	4.39	284.9/133	1713.72
Kampferol	4.45	284.9/93	146.06	4.46	284.9/93	1468.78
İsoramnetin	4.29	314.9/299.9	197.15	4.28	314.9/299.9	299.73
Jasmonik Asit	4.50	209/59.1	9.18	4.56	209/59.1	0
Apigenin	4.50	268.9/116.8	47.94	4.51	268.9/116.8	109.30

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Çizelge 4.9. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Hicaz türü nar kabuğu ekstraktının (Hicaz-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Hicaz-USE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Hicaz-USE* (ppb)**
Gallik Asit	1.63	168.9/125	309.61	1.66	168.9/125	5955.59
Protokateşik Asit	1.93	153.1/109.1	42.47	1.99	153.1/109.1	229.12
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	15.85	2.13	152.9/107.9	558.49
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Kafeik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Klorojenik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Kateşin	3.89	288.9/245	105.81	3.86	288.9/245	0
Epikateşin	3.90	288.9/245	88.95	3.81	288.9/245	0
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	-	-	ND	-	-	ND
Verbaskosit	-	-	ND	-	-	ND
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.01	609/299.9	27.52	4.04	609/299.9	0
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	4.07	163.1/118.9	117.71	4.02	163.1/118.9	375.06
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	4.16	193/134.1	0	4.12	193/134.1	67.60
Etil Gallat	4.19	197/124	1384.77	4.20	197/124	1226.90
Florizin	4.25	434.8/272.9	435.77	4.25	434.8/272.9	16.97
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	-	-	ND	-	-	ND
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.28	317/150.9	289.60	4.27	317/150.9	2202.78
Ellajik Asit	4.15	300.9/284	770021.55	4.18	300.9/284	866481.21
Propil Gallat	4.32	211/124.1	0	4.27	211/124.1	0
Kersetin	4.34	301/150.9	118.73	4.34	301/150.9	416.50
Absisik Asit	4.38	262.9/253	1492.87	4.40	262.9/253	2150.17
Lütolein	4.38	284.9/133	78.13	4.39	284.9/133	663.86
Kamferol	4.46	284.9/93	105.55	4.49	284.9/93	1391.34
İsoramnetin	4.28	314.9/299.9	167.18	4.29	314.9/299.9	287.43
Jasmonik Asit	4.50	209/59.1	5.60	4.46	209/59.1	0
Apigenin	4.51	268.9/116.8	39.82	4.51	268.9/116.8	92.61

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Analiz edilen Domat ve Gemlik türü zeytin yapraklarında Gallik Asit, Protokateşik Asit, 2,5-Dihidroksibenzoik Asit, Salisilik Asit, Kafeik Asit, Klorojenik Asit, Verbaskosit, Rutin, Oleuropein, Kersetin, Lutolein, İsoramnetin ve Apigenin bulundu. Her iki ekstraksiyon çeşidi ile elde edilen ekstraktlarda miktar farklılığı olmasına rağmen, aynı fenolik bileşiklerin var olduğu

görüldü. En yüksek miktarda Oleuropein, Klorojenik Asit ve Protokateşik Asit bulundu (Çizelge 4.10 - Çizelge 4.13).

Çizelge 4.10. Çalkalamalı subanyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Domat türü zeytin yaprağı ekstraktının (Domat-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (min)**	**[M-H-]/ Fragment (m/z)**	**Domat-SBE (ppb)**	**Retention time (min)**	**[M-H-]/ Fragment (m/z)**	**Domat-SBE* (ppb)**
Gallik Asit	1.71	168.9/125	5.38	1.70	168.9/125	527.00
Protokateşik Asit	1.90	153.1/109.1	710.85	1.96	153.1/109.1	2950.26
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	88.76	2.13	152.9/107.9	1754,24
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	3.68	136.8/93.1	15.94	3.69	136.8/93.1	38.19
Kafeik Asit	3.68	179/135.1	76.12	3.76	179/135.1	1389.10
Klorojenik Asit	3.72	352.9/191	2395.63	3.71	352.9/191	1437.05
Kateşin	-	-	ND	-	-	ND
Epikateşin	-	-	ND	-	-	ND
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	3.98	137/119	0	3.97	137/119	1390.59
Verbaskosit	3.97	623/161.1	178.54	3.99	623/161.1	62.09
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.00	609/299.9	325.78	4.01	609/299.9	14.90
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	3.28	163.1/118.9	0	4.06	163.1/118.9	84.57
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	3.39	193/134.1	0	4.09	193/134.1	181.14
Etil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	4.37	539/275.1	30715.84	4.25	539/275.1	6666.50
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.51	317/150.9	0	3.96	317/150.9	540.32
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.55	301/150.9	20.80	4.34	301/150.9	125.05
Absisik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Lütolein	4.43	284.9/133	76.36	4.40	284.9/133	2117.39
Kamferol	4.49	284.9/93	0	4.45	284.9/93	338.29
İsoramnetin	4.49	314.9/299.9	39.02	4.49	314.9/299.9	33.24
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.54	268.9/116.8	10.47	4.52	268.9/116.8	155.04

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Çizelge 4.11. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Domat türü zeytin yaprağı ekstraktının (Domat-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Domat-USE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Domat-USE* (ppb)**
Gallik Asit	1.69	168.9/125	20.88	1.71	168.9/125	660.43
Protokateşik Asit	1.91	153.1/109.1	1088.58	1.97	153.1/109.1	3380.96
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	121.96	2.13	152.9/107.9	2170.85
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	3.67	136.8/93.1	9.44	3.67	136.8/93.1	45.13
Kafeik Asit	3.69	179/135.1	88.35	3.77	179/135.1	1540.44
Klorojenik Asit	3.72	352.9/191	2621.13	3.72	352.9/191	1629.89
Kateşin	-	-	ND	-	-	ND
Epikateşin	-	-	ND	-	-	ND
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	3.97	137/119	0	3.98	137/119	1549.20
Verbaskosit	3.98	623/161.1	515.37	3.99	623/161.1	156.47
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.00	609/299.9	417.76	4.01	609/299.9	10.99
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	3.32	163.1/118.9	0	4.06	163.1/118.9	62.58
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	3.28	193/134.1	0	4.10	193/134.1	81.70
Etil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	4.37	539/275.1	34090.33	4.25	539/275.1	5815.68
Resveratrol	-	-	ND	4.40	-	ND
Mirisetin	4.49	317/150.9	0	4.01	317/150.9	255.73
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.50	301/150.9	224.19	4.34	301/150.9	133.51
Absisik Asit	-	-	ND	4.47	-	ND
Lütolein	4.47	284.9/133	111.37	4.42	284.9/133	2583.93
Kamferol	4.39	284.9/93	0	4.42	284.9/93	229.99
İsoramnetin	4.50	314.9/299.9	197.97	4.53	314.9/299.9	38.90
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.47	268.9/116.8	6.52	4.53	268.9/116.8	352.73

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Çizelge 4.12. Çalkalamalı subanyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Gemlik türü zeytin yaprağı ekstraktının (Gemlik-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Gemlik-SBE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Gemlik-SBE* (ppb)**
Gallik Asit	1.70	168.9/125	8.80	1.71	168.9/125	161.19
Protokateşik Asit	1.92	153.1/109.1	812.87	1.97	153.1/109.1	5178.22
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	1393.07	2.13	152.9/107.9	4858.05
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	3.68	136.8/93.1	125.88	3.68	136.8/93.1	229.33
Kafeik Asit	3.71	179/135.1	57.22	3.75	179/135.1	501.71
Klorojenik Asit	3.71	352.9/191	957.90	3.70	352.9/191	746.24
Kateşin	-	-	ND	-	-	ND
Epikateşin	-	-	ND	-	-	ND
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	3.48	137/119	0	4.03	137/119	1866.62
Verbaskosit	3.97	623/161.1	163.34	3.98	623/161.1	66.03
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.00	609/299.9	574.56	4.03	609/299.9	28.24
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	3.33	163.1/118.9	0	4.06	163.1/118.9	32.28
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	3.30	193/134.1	0	4.09	193/134.1	113.23
Etil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	4.31	539/275.1	21708.04	4.26	539/275.1	3675.80
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.15	317/150.9	0	3.98	317/150.9	603.04
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.54	301/150.9	59.15	4.35	301/150.9	327.03
Absisik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Lütolein	4.45	284.9/133	395.75	4.42	284.9/133	4243.64
Kamferol	4.43	284.9/93	0	4.40	284.9/93	905.80
İsoramnetin	4.49	314.9/299.9	50.96	4.50	314.9/299.9	68.68
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.53	268.9/116.8	40.87	4.51	268.9/116.8	443.06

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Çizelge 4.13. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Gemlik türü zeytin yaprağı ekstraktının (Gemlik-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Gemlik-USE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Gemlik-USE* (ppb)**
Gallik Asit	1.69	168.9/125	11.25	1.71	168.9/125	279.92
Protokateşik Asit	1.91	153.1/109.1	1305.40	1.97	153.1/109.1	5024.46
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.10	152.9/107.9	542.64	2.13	152.9/107.9	4579.77
Şiringik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Salisilik Asit	3.67	136.8/93.1	58.32	3.67	136.8/93.1	141.34
Kafeik Asit	3.69	179/135.1	88.28	3.76	179/135.1	769.29
Klorojenik Asit	3.71	352.9/191	1942.71	3.70	352.9/191	1277.01
Kateşin	-	-	ND	-	-	ND
Epikateşin	-	-	ND	-	-	ND
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	3.33	137/119	0	3.97	137/119	940.22
Verbaskosit	3.98	623/161.1	310.09	3.98	623/161.1	63.89
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	4.00	609/299.9	1037.49	4.00	609/299.9	36.62
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	4.69	163.1/118.9	0	4.06	163.1/118.9	36.12
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	3.28	193/134.1	0	4.09	193/134.1	87.94
Etil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	4.35	539/275.1	33030.91	4.24	539/275.1	3716.49
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.46	317/150.9	0	3.95	317/150.9	167.94
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.50	301/150.9	360.38	4.34	301/150.9	265.10
Absisik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Lütolein	4.43	284.9/133	221.78	4.40	284.9/133	5814.62
Kamferol	4.41	284.9/93	0	4.43	284.9/93	555.40
İsoramnetin	4.50	314.9/299.9	177.85	4.55	314.9/299.9	49.79
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.51	268.9/116.8	25.62	4.54	268.9/116.8	420.20

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Analiz edilen tetra yaprağında Gallik Asit, Protokateşik Asit, 2,5-Dihidroksibenzoik Asit, Şiringik Asit, Salisilik Asit, Kafeik Asit, Klorojenik Asit, Kateşin, Epikateşin, Etil Gallat, Mirisetin, Kersetin, Absisik Asit, Lütolein, Kamferol, İsoramnetin ve Apigenin bulundu. Tetra-USE'ye göre Tetra-SBE'de Verbaskosit daha az miktarda tayin edildi. Her iki ekstraksiyon

yöntemi ile elde edilen ekstraktlarda miktar farklılığı olmasına rağmen, en yüksek miktarda Gallik Asit, Protokateşik Asit, Mirisetin, Etil Gallat ve Şiringik Asit bulundu (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. Çalkalamalı subanyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen Tetra yaprağı ekstraktının (Tetra-SBE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Tetra-SBE (ppb)**	**Alıkonma zamanı (dk)**	**[M-H-]/ Fragman (m/z)**	**Tetra-SBE* (ppb)**
Gallik Asit	1.71	168.9/125	26749.61	1.77	168.9/125	106278.27
Protokateşik Asit	1.94	153.1/109.1	24101.96	1.99	153.1/109.1	28472.49
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.45	152.9/107.9	330.54	2.48	152.9/107.9	253.74
Şiringik Asit	3.73	196.9/182.1	750.66	3.76	196.9/182.1	23309.21
Salisilik Asit	3.69	136.8/93.1	81.74	3.72	136.8/93.1	125.14
Kafeik Asit	3.67	179/135.1	171.40	3.71	179/135.1	1581.55
Klorojenik Asit	3.70	352.9/191	50.11	3.71	352.9/191	42.79
Kateşin	3.85	288.9/245	144.75	3.84	288.9/245	0
Epikateşin	3.85	288.9/245	131.41	3.81	288.9/245	0
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	-	-	ND	-	-	ND
Verbaskosit	3.71	623/161.1	0	4.48	623/161.1	0
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	-	-	ND	-	-	ND
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Etil Gallat	4.26	197/124	1935.25	4.14	197/124	408.48
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	-	-	ND	-	-	ND
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.33	317/150.9	2975.12	4.33	317/150.9	206091.38
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.41	301/150.9	249.26	4.44	301/150.9	5283.76
Absisik Asit	4.41	262.9/253	235.06	4.40	262.9/253	85.18
Lütolein	4.40	284.9/133	55.16	4.47	284.9/133	64.41
Kamferol	4.48	284.9/93	94.76	4.51	284.9/93	2384.19
İsoramnetin	4.44	314.9/299.9	17.06	4.57	314.9/299.9	85.49
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.48	268.9/116.8	2.97	4.52	268.9/116.8	17.28

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

Çizelge 4.15. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen Tetra yaprağı ekstraktının (Tetra-USE) ve hidrolizlenmiş ekstraktın içerdiği fenolik bileşenler

Bileşikler	Alıkonma zamanı (dk)	[M-H-]/ Fragman (m/z)	Tetra-USE (ppb)	Alıkonma zamanı (dk)	[M-H-]/ Fragman (m/z)	Tetra-USE* (ppb)
Gallik Asit	1.71	168.9/125	28581.10	1.78	168.9/125	109627.03
Protokateşik Asit	1.94	153.1/109.1	22343.19	1.99	153.1/109.1	25858.95
2,5-Dihidroksibenzoik Asit	2.44	152.9/107.9	282.54	2.40	152.9/107.9	459.25
Şiringik Asit	3.76	196.9/182.1	853.69	3.76	196.9/182.1	19996.42
Salisilik Asit	3.68	136.8/93.1	75.48	3.70	136.8/93.1	123.92
Kafeik Asit	3.68	179/135.1	236.76	3.71	179/135.1	1545.33
Klorojenik Asit	3.72	352.9/191	85.94	3.73	352.9/191	47.72
Kateşin	3.86	288.9/245	128.68	3.83	288.9/245	0
Epikateşin	3.86	288.9/245	92.36	3.80	288.9/245	0
Giberellik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Tirozol	-	-	ND	-	-	ND
Verbaskosit	3.62	623/161.1	9.36	4.10	623/161.1	0
Sinapik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Rutin	-	-	ND	-	-	ND
2-Hidroksitranssinnamik Asit	-	-	ND	-	-	ND
p-Kumarik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Naringin	-	-	ND	-	-	ND
trans-Ferulik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Etil Gallat	4.14	197/124	752.61	4.14	197/124	633.24
Florizin	-	-	ND	-	-	ND
İndole-3-asetik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Oleuropein	-	-	ND	-	-	ND
Resveratrol	-	-	ND	-	-	ND
Mirisetin	4.39	317/150.9	1151.38	4.38	317/150.9	101243.66
Ellajik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Propil Gallat	-	-	ND	-	-	ND
Kersetin	4.45	301/150.9	134.77	4.46	301/150.9	3811.90
Absisik Asit	4.41	262.9/253	174.27	4.48	262.9/253	84.46
Lütolein	4.45	284.9/133	36.97	4.46	284.9/133	57.14
Kamferol	4.41	284.9/93	28.02	4.50	284.9/93	2085.71
İsoramnetin	4.46	314.9/299.9	16.25	4.55	314.9/299.9	98.97
Jasmonik Asit	-	-	ND	-	-	ND
Apigenin	4.51	268.9/116.8	1.74	4.52	268.9/116.8	12.66

nd = Tayin edilmedi
*Hidrolizlenmiş ekstrakt

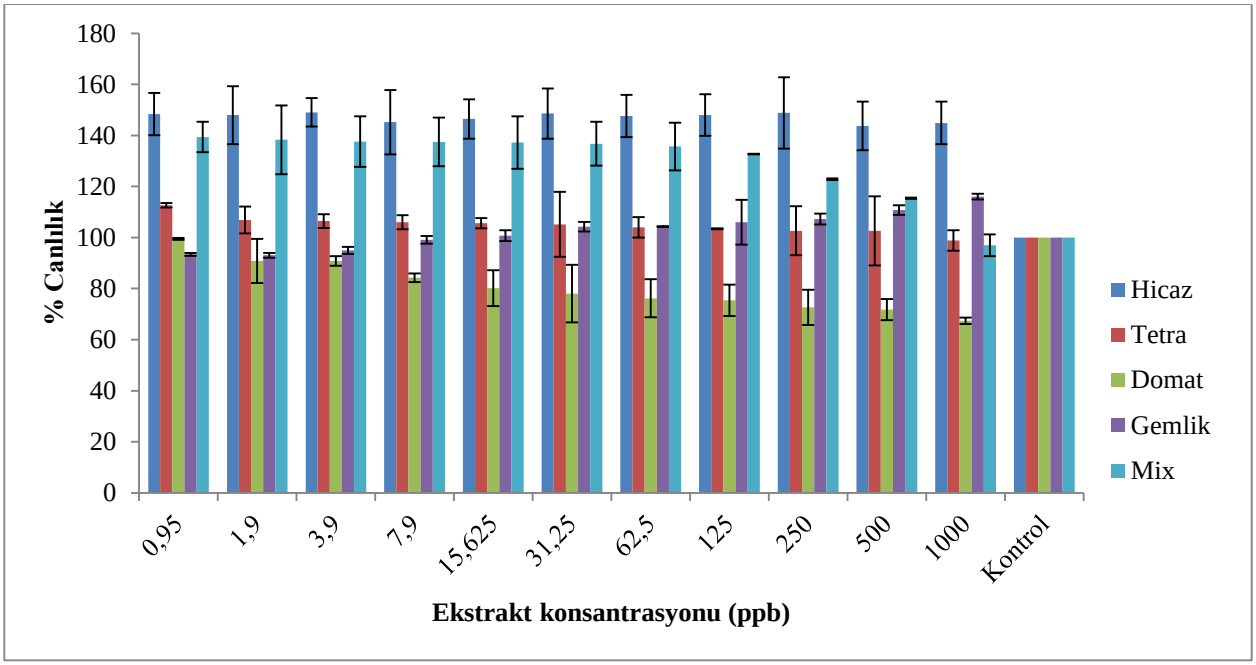
Hicaz türü nar kabuğu ve tetra yaprağında çalkalamalı su banyosundaki ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların bileşen miktarları daha iyi iken, Domat ve Gemlik türü zeytin yapraklarında ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların bileşen miktarlarının daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca Oleuropein ve Tirozol sadece zeytin yapraklarında tayin

edildi. Genel olarak tüm deney sonuçları değerlendirildiğinde, MTT testi ve DNA hasarı onarım deneylerine ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktlar ile devam edildi.

4.5. Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi (MTT Testi)

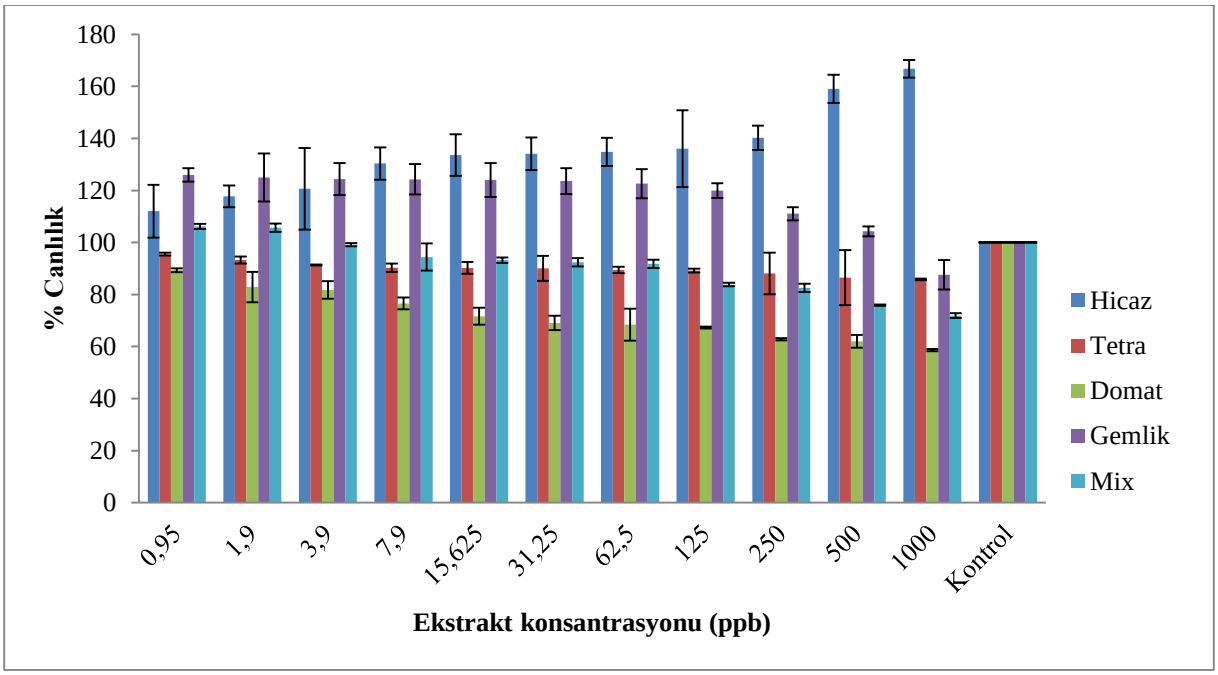
Sitotoksisite testleri ilaç olması muhtemel maddeler veya toksik etkisi bilinmeyen maddeler hakkında bilgi veren testlerdir (Tokur ve Aksoy, 2017). Öncelikle hücre kültürleri 24 saat ve 48 saat herbir ekstraktın farklı dozları ile inkübe edildi ve süre sonunda MTT çözeltisi ile muamele edilerek hücrelerin canlılık oranı ve ekstraktların hücreler üzerindeki etkileri değerlendirildi. Çalışmada Hicaz türü nar kabuğu, tetra yaprağı, Domat ve Gemlik türü zeytin yapraklarına ek olarak, Mix olarak adlandırılan eşit oranlarda nar kabuğu, tetra ve Domat zeytin yaprağı ekstraktlarından oluşan karışım kullanıldı. Çalışmada kullanılan herbir bitkisel örneğin sağlıklı karaciğer hücre hattı (AML12) üzerindeki etkisi ve kanserli karaciğer hücre hattı (Hep3B) üzerindeki etkisi değerlendirildi.

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, 24 saat inkübasyon sonrası yapılan analizde kontrole göre Domat zeytin yaprağı hariç tüm ekstraktların sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği, yani sağlıklı hücrelere zarar vermediği belirlendi. Ekstrakt konsantrasyonun artması ile Domat zeytin yaprağı ekstraktının sağlıklı hücreler üzerinde %32'ye varan bir canlılık azalmasına neden olduğu gözlendi. Hicaz nar kabuğu ve Mix ekstraktlarının, ve artan konsantrasyonlarda da Gemlik zeytin yaprağı ekstraktının sağlıklı hücreleri bir miktar çoğalttığı görüldü. Örnekler arasında, tetra yaprağından elde edilen ekstraktın hücreler üzerinde en uygun koruyucu etkiye sahip olduğu görüldü.



Şekil 4.3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların AML12 hücre hattı üzerinde etkileri (24 saat maruziyet)

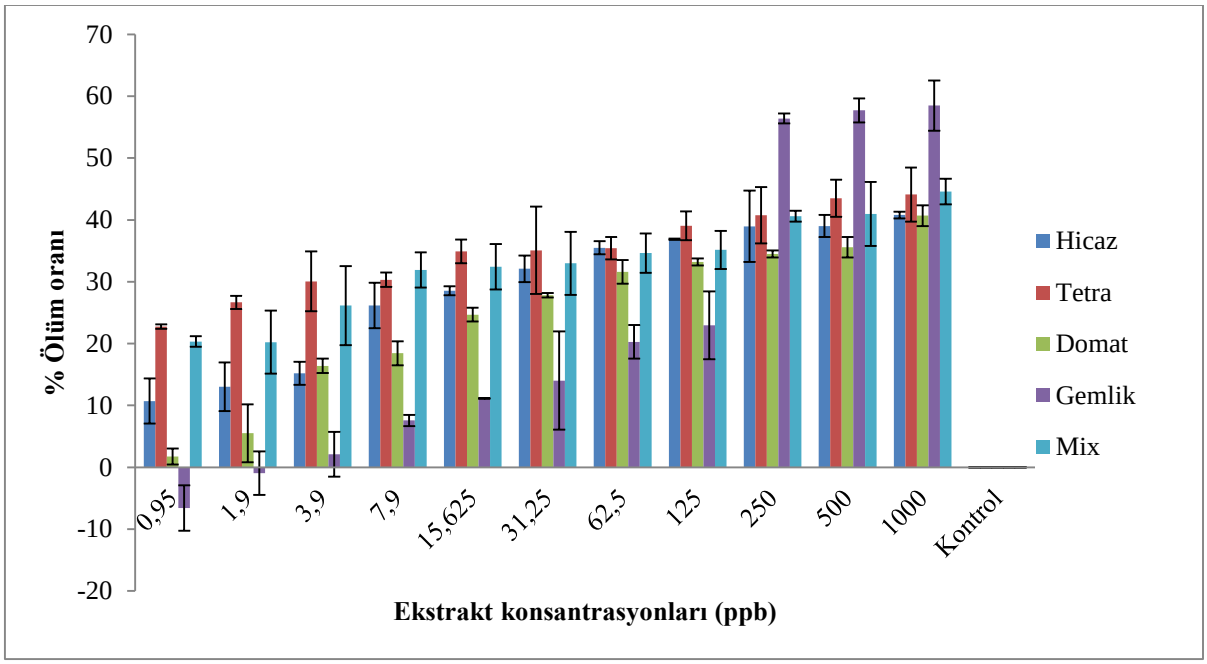
Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, 48 saat inkübasyon sonrası yapılan analizde, kontrole göre Domat zeytin yaprağı hariç Gemlik, Hicaz türü nar kabuğu ve Mix ekstraktlarının sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği, hücreleri koruduğu ve sağlıklı hücrelerin çoğalması üzerinde etkili olduğu görüldü. Ancak 48 saat inkübasyon sonucunda sürenin uzamasıyla tetra yaprağı ekstraktında % 14'e ve Mix ekstraktının da yüksek konsantrasyonunda % 28'e varan hücre canlılık oranı azalması gözlendi.



Şekil 4.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların AML12 hücre hattı üzerinde etkileri (48 saat maruziyet)

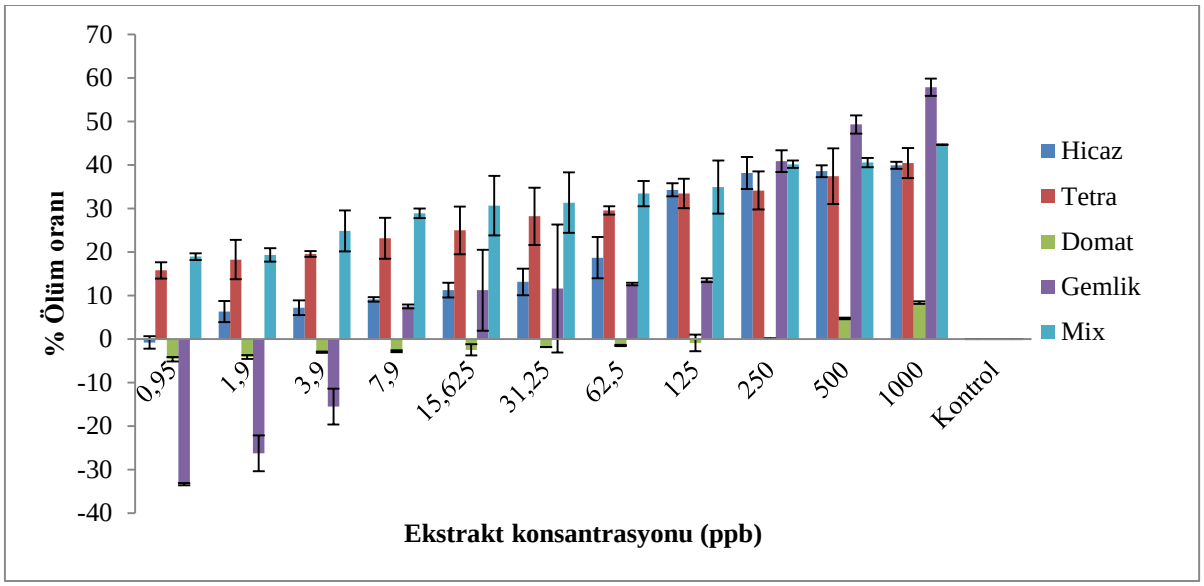
Ekstraktların AML12 hücre hattı üzerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda, sağlıklı hücrelerde Domat zeytin yaprağı dışında, diğer örneklerin toksik etkisinin olmadığı ancak değişen oranlarda hücre çoğalma etkisine sahip olduğu görüldü. 48 saatlik inkübasyon sonucunda ise Hicaz türü nar kabuğunun hücre çoğaltma etkisi devam ederken, diğer ekstraktlar uzayan süreyle birlikte ve artan dozlarında sağlıklı hücreler üzerinde değişen oranlarda sitotoksik etki gösterdi. AML12 hücre hattı üzerinde en iyi inkübasyon süresi 24 saat ve en etkili örnek tetra yaprağından elde edilen ekstrakt olarak belirlendi.

Şekil 4.5'da görüldüğü gibi, 24 saat inkübasyon sonrası yapılan analizde, kontrole göre Hicaz nar kabuğu, tetra yaprağı, Mix, Domat ve Gemlik zeytin yaprakları ekstraktları karaciğer kanserli hücreler (Hep3B) üzerinde sitotoksik etki gösterdi. Ekstraktların sitotoksik özelliğinin konsantrasyonun artmasıyla %40-58 oranlarına kadar arttığı görüldü. 24 saatin sonunda tetra yaprağı ve Mix ekstraktları düşük dozlardan itibaren ve özellikle Gemlik zeytin yaprağı ekstraktı ise yüksek dozlarında en yüksek düzeyde sitotoksik etki gösterdiler.



Şekil 4.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların Hep3B hücre hattı üzerinde etkileri (24 saat maruziyet)

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi 48 saatlik inkübasyon sonrası yapılan ölçümde Mix, tetra yaprağı, Hicaz nar kabuğu ve Gemlik zeytin yaprağı ekstraktlarının kontrole göre kanserli hücreler (Hep3B) üzerinde sitotoksik etki gösterdiği yani kanserli hücreleri yok etmede etkili olduğu görüldü. İnkübasyon süresinin uzamasıyla Domat zeytin yaprağı diğer ekstraktlar içinde kontrole göre yüksek oranda sitotoksik etki göstermedi. Ekstrakt konsantrasyonun artmasıyla ekstraktların kanserli hücreler üzerine olan sitotoksik etkilerinin artmasına rağmen, 24 saatlik inkübasyon süresi ile karşılaştırıldığında; düşük dozlarda ölüm oranlarının düşük ve yüksek dozlardaki ölüm oranlarının da 24 saattlik inkübasyon süresindeki değerlere yakın olduğu görülmektedir. Bu sebeple Hep3B hücre hattı üzerinde en iyi inkübasyon süresinin 24 saat olduğu ve düşük konsantrasyonlarında da sitotoksik etkili olan tetra yaprağı ve Mix ekstraktlarının daha etkiliekstraktlar olduğu görüldü.



Şekil 4.6. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktların Hep3B hücre hattı üzerinde etkileri (48 saat maruziyet)

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'ya göre Hep3B hücre hattı üzerinde tüm ekstraktlar 48 saatlik (Domat ekstraktı hariç) ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda yakın oranlarda sitotoksik özellik göstermekte olup, Mix ve tetra yaprağı ekstraktları daha etkilidir.

Çizelge 4.16'da görüldüğü gibi, en yüksek sitotoksik etkiye sahip olan örnekler, en düşük IC_{50} değerine sahip olan tetra yaprağı ve Mix ekstraktlarıdır. Domat zeytin yaprağı ekstraktı Hep3B hücre hattı üzerinde güçlü sitotoksik etki göstermedi. Çalışılan örnekler için sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde en iyi inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

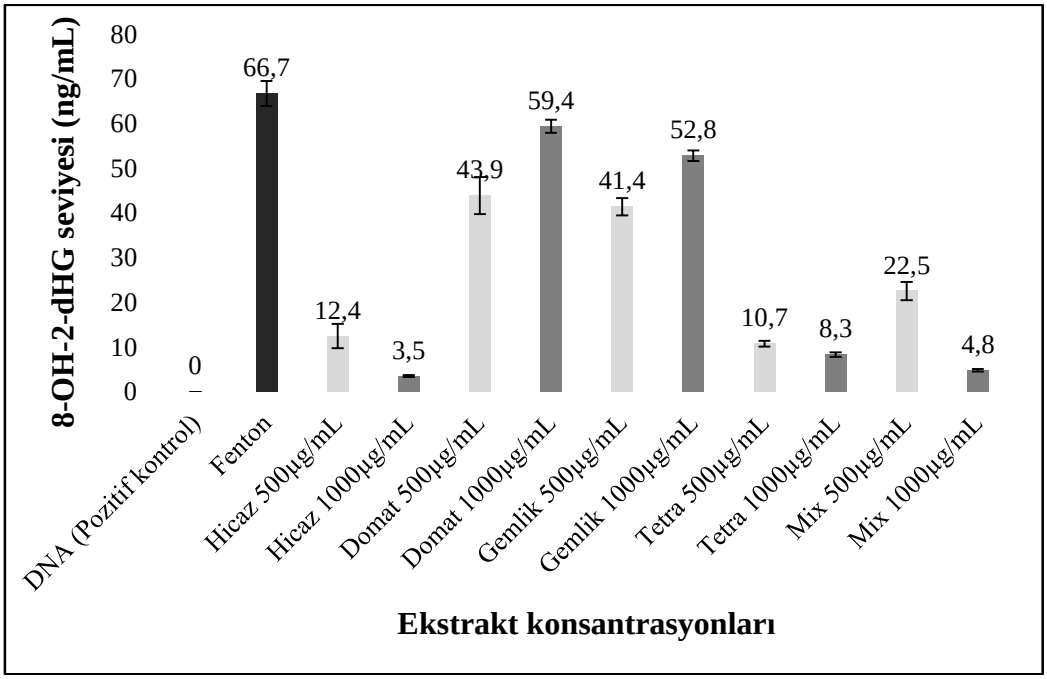
Çizelge 4.16. Örneklerin AML12 ve Hep3B hücre hatları üzerinde IC_{50} değerleri

	IC_{50} değerleri (ppb)			
	AML12		**Hep3B**	
Ekstrakt	**24 saat**	**48 saat**	**24 saat**	**48 saat**
Hicaz nar kabuğu	2,60	3,01	16,32	31,17
Tetra yaprağı	3,59	4,19	12,21	16,22
Gemlik yaprağı	3,86	3,13	36,35	-152,34
Domat yaprağı	4,48	5,00	20,82	-307,69
Mix	2,82	3,98	13,29	13,97

IC_{50} değerleri MS Excel ile hesaplanmıştır.
(-) değeri hücre çoğalmasının devam etiğini göstermektedir.

4.6. DNA Üzerinde Oksidatif Hasar Oluşturulması ve Ekstraktların Koruyucu Gücünün Araştırılması

Ticari olarak satın alınan buzağı timus DNA üzerinde Fenton reaksiyonu ile meydana gelen hidroksil radikali vasıtasıyla oksidatif hasar oluşturuldu. Oksidatif DNA hasar düzeylerinin belirteci olan 8-OH-2-dHG seviyeleri (ppb) LC-MS/MS cihazı ile ölçülerek tespit edildi. Hasarlı DNA üzerinde iki değişik konsantrasyonda (500 ve 1000 μg/mL) uygulanan tetra yaprağı, Hicaz nar kabuğu, Domat zeytin yaprağı, Gemlik zeytin yaprağı ve Mix (Hicaz nar kabuğu+tetra yaprağı+Domat zeytin yaprağı ekstraktları karışımı) ekstraktlarının DNA hasarını önlemede etkili olduğu bulundu (Şekil 4.7). Tetra yaprağı, Hicaz nar kabuğu ve Mix ektraktları çalışılan her iki konsantrasyonda DNA oksidatif hasarını önleyici etki gösterdi. Domat ve Gemlik zeytin yaprağı ekstraktlarında ise çalışılan diğer örneklere göre yüksek, ancak Fenton reaksiyonu gerçekleştirilen DNA tüpüne göre daha düşük OH-2-dHG seviyeleri tayin edildi. Oksidatif DNA hasarına karşı örneklerin önleyici etkisi Hicaz nar kabuğu >Tetra yaprağı > Mix >Gemlik zeytin yaprağı ≥ Domat zeytin yaprağı sıralamasındadır.



Şekil 4.7. Fenton reaksiyonu ile oluşturulan oksidatif DNA hasarı üzerine ekstraktların koruyucu etkisi (ortalama ± standard sapma, n = 3)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Doğada yetişen çoğu bitkinin çeşitli hastalıklar üzerinde etkili oldukları bir gerçektir. Bitkiler, ikincil metabolitleri olarak çeşitli bileşikleri içeren ve bu sayede yeni ilaç moleküllerinin keşfine olanak sağlayan doğal kaynaklardır. Kanser alanındaki ilaçların %62 kadarı sentetik olmayan, doğal kökenli küçük kimyasal moleküllerdir (Newman, Cragg ve Snader, 2003). Günümüzde bitkisel doğal ürünlerden biyolojik aktif bileşiklerin araştırılması ve tanımlanması konusundaki çalışmalar devam etmektedir. Özellikle besin olarak tüketilmeyen bitkilerin yapraklarından veya atık ürün olan bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktların içerdikleri fitobileşenler sayesinde tıp, eczacılık ve endüstri alanına katma değer olarak kazandırılması sözkonusudur. Bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiviral aktivitelerinin yanısıra son yıllarda DNA hasarı üzerine koruyucu etkisi ile ilgili olarak çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada da nar kabuğu, zeytin yaprakları ve tetra bitkisinden elde edilen etanolik ekstraktların antioksidan, karaciğer kanser hücresi üzerinde sitotoksik ve DNA üzerinde koruyucu etkileri yönünden incelenmesi amaçlanmıştır.

Bitki ekstraktı eldesi için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon, doğal ve atık bitkisel kaynaklardan özellikle fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda yüksek ekstrakt verimi ve kalitesi sağlayan ucuz ve basit bir ekstraksiyon tekniğidir (Ali ve Kumar, 2015; Wang, Zhou ve Lin, 2011). Ultrasonik ses dalgası etkisiyle hücre duvarları hasar görerek doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin çözücüye geçmesi kolaylaşmaktadır. Son zamanlarda ultrasonik destekli ekstraksiyon, geleneksel çözücü ekstraksiyonlarına göre avantajlı olduğu için sıkça kullanılmaktadır. Sunulan çalışmada, ekstrakt eldesi için ultrasonik ekstraksiyon (USE) ve geleneksel ekstraksiyon metodlarından biri olan su

banyosunda çalkalayarak ekstraksiyon (SBE) yöntemi kullanılmıştır. Biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için geleneksel ve ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniklerini kıyaslamak üzere yapılan diğer çalışmalarda da ultrasonik uygulamadan elde edilen ekstraktların daha verimli olduğunu görülmüştür. Limon kokulu çay ağacı (*Leptospermum petersonii*) yaprakları için ultrasonik destekli tekniğin, geleneksel çalkalamalı su banyosu ekstraksiyonuna kıyasla toplam fenolikler ve antioksidan kapasite yönünden daha verimli olduğu bildirilmiştir (Saifullah vd., 2020). *Bauhinia purpurea* yaprağı ile yapılan çalışmada Soxhlet cihazı, ultrasonikasyon (USE) ve maserasyon ile ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktlar için, antioksidan ve antibakteriyel maddelerin ekstraksiyonunda ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin diğerlerine göre daha iyi bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Annegowda, Mordi, Ramanathan, Hamdan ve Mansor, 2011). Benzer şekilde Wang vd. (2011), *C. sulcate* meyvesindeki ve kabuğundaki antioksidanlar için ultrasonik ekstraksiyon, yüksek basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyon metodlarını karşılaştırıp, antioksidanların ekstraksiyonu için USE metodun ideal bir yöntem olduğunu önermişlerdir. Tez çalışmamızda, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminden elde edilen ekstraktlar, çalkalamalı su banyosu kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlara kıyasla daha iyi sonuçlar göstermiştir.

Doğal bir kaynak olan bitkiler besleyici olmalarının yanında, içerdikleri bileşenler sayesinde antiviral, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antiinflamatuvar, antidiyabetik etki gibi çeşitli biyolojik etkiler göstermektedirler. Modern tıbbın önerdiği ilaç tedavisine paralel olarak, halk arasında bitkilerin kök, yaprak, dal ve kabuklarından hazırlanan çayların veya özütlerin kullanımı halen bir seçenek olarak devam etmektedir. Antioksidan özelliği bulunan bu doğal bileşenler lipid, DNA ve diğer biyomoleküllerin oksidasyonunu geciktirerek veya radikalik zincir reaksiyonlarının ilerlemesini engelleyerek antiradikalik etki ve oksidatif hasarı engelleme özelliği gösterirler. Bu yüzden, son zamanlarda fitobileşence zengin bitkisel ürünlere olan ilgi daha da artmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan zeytin yaprağı (Domat ve Gemlik türleri), nar kabuğu (Hicaz türü) ve tetra yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini belirlemek için $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme metodları çalışılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle toplam fenolik ve flavonoid

madde miktar tayinleri yapılarak, LC-tandem MS analizi ile fenolik bileşenlerin içerikleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktının içerdiği fenolik bileşikler sayesinde iyi derecede antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Benavente-Garcia vd., 2000). Elgin-Cebe vd. (2012) çalışmalarında zeytin yaprak infüzyonunun antioksidan etkisini araştırmış ve antioksidan kapasitesinin standart olarak kullandıkları BHT'ye göre, DPPH giderme yönteminde %50, TEAC yönteminde %67 ve molibden indirgeme yönteminde %68 oranında olduğunu belirtmişlerdir (Elgin Cebe, Konyalıoğlu ve Zeybek, 2012). 21 farklı zeytin ağacı yaprağından elde edilen su ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, Domat türü zeytin yaprağının toplam fenolik miktarı 98.85±2.16 µg GAE/g, flavonoid miktarı 6.74±0.6 µg KE/mg ve Gemlik türü zeytin yaprağının toplam fenolik miktarı 86.76±3.29 µg GAE/g, flavonoid miktarı 6.76±0.02 µg KE/mg olarak rapor edilmiştir. İndirgeme gücü (EC_{50}= 0.180 mg/mL), DPPH radikali (EC_{50}= 0.059 mg/mL) ve süperoksit radikali (EC_{50}= 0.044 mg/mL) giderme metodlarında diğer zeytin türlerine göre Domat türü en iyi olup, standart maddeler ile kıyaslanabilir aktiviteler göstermiştir. Aynı çalışmada Gemlik türünden elde edilen su ekstraktının indirgeme gücü EC_{50}= 0.290 mg/mL, DPPH radikal giderme aktivitesi EC_{50}= 79 µg/mL ve süperoksit radikali giderme gücü EC_{50}= 0.080 mg/mL olarak bildirilmiştir (Orak, Selen İşbilir ve Yağar, 2012b). Lins vd. zeytin yaprağının antioksidan aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında toplam fenolik miktarını 131.7±9.4 mg GAE/g, flavonoid miktarını 19.4±1.3 mg KE/g, DPPH metodu için EC_{50}= 13.8 µg/mL ve ABTS metodu için EC_{50}= 16.1 µg/mL olarak bildirmişlerdir (Lins, Pugine, Scatolini ve de Melo, 2018). Zeytin yaprağının antioksidan özelliğini araştıran diğer bir çalışmada; dört farklı çözücü ile elde edilen ekstraktlardan toplam fenolik madde miktarı, indirgeme gücü ve linoleik asit indirgemesi testlerinde metanol ekstraktı, Fe^{+2} indirgeme, DPPH ve süperoksit radikallerini giderme testlerinde ise etil asetat ekstraktı daha yüksek aktivite göstermiştir (Erdoğan, Akkol ve Avcı, 2020). Çizelge 4.17'de literatürde çalışılan tetra, nar ve zeytin bitkilerinin çeşitli kısımlarına ait fenolik ve flavonoid madde miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.17. Tezde çalışılan bitkilerin fenolik ve flavonoid madde miktarlarının literatür ile karşılaştırılması

Çalışılan örnek	Çalışılan örneğin kısmı	Toplam fenolik madde içeriği	Toplam Flavonoid madde içeriği	Kaynak
Nar-Hicaz (Etanol ekstraktı)	Kabuk			Bu çalışmada
USE		157.3 ±8.202 µg GAE/mg	06.04 ±12.570µg KE/mg	
SBE		168.19 ± 7.226 µg GAE/mg	112.36 ±10.852µg KE/mg	
Nar -Bhagwa (Etanol ekstraktı)		354.67 mg GAE/g	-	Foujdar, Bera ve Chopra, 2019
Nar-Derik (Etanol ekstratı)	Suyu	3 170±188 (µg GAE/mL su	-	Toptancı, 2018
	Kabuk	430.0±22.0 µg GAE/g kabuk		
Nar-Nabli (Metanol ekstraktı)	Kabuk	121.7 ± 16.6 mg GAE 100 /g	13.4 ± 1.6 mg RE 100/ g	Fellah, Bannour, Rocchetti, Lucini ve Ferchichi, 2018
	Çiçek	158.4 ± 13.8 mg GAE 100 /g	9.1 ± 0.6 mg RE 100/ g	
	Yaprak	79.7 ± 2.7 mg GAE 100/g	5.5 ± 0.9 mg RE 100/ g	
Nar-Gabsi (Metanol ekstraktı)	Kabuk	129.0 ± 26.7 mg GAE 100/g	19.2 ± 1.1 mg RE 100/ g	
	Çiçek	111.4 ± 10.9 mg GAE 100/g	6.5 ± 1.0 mg RE 100/ g	
	Yaprak	118.9 ± 12.5 mg GAE 100/g	6.2 ± 0.9 mg RE 100/ g	
Nar	Suyu	0.35±0.002 mg GAE/100 g	0.21±0.004 mg KE/g	Bouasla vd., 2016
Nar-Hicaz (Metanol, etanol ve su ekstraktı)	Kabuk	126.11 ±0.40 – 212.48 ±0.65 µg GAE/g	9.44±0.02 − 20.52±0.10 µg KE/mg	Orak, Yağar ve Selen İşbilir, 2012a
Nar-Yemeni (Metanol ekstraktı)	Kabuk	274.1 ± 17.2 mg GAE/g	56.4 ± 2.7 mg RE/g	Shiban, Al-Otaibi ve Al-Zoreky, 2012
(Su ekstraktı)		91.2 ± 09.5 mg GAE/g	-	
(Eter ekstraktı)		08.5 ± 11.5 mg GAE/g	-	
Nar -Shishe kab (Su ve metanol ekstraktı)	Kabuk	325.23 ± 20.0	-	Tehranifar, Selahvarzi, Kharrazi ve Bakhsh, 2011
	Çekirdek	302.3 ± 15.1		
	Yaprak	116.1 ± 9.7		

Zeytin-Domat (Etanol ekstraktı) USE SBE	Yaprak	 108.18 ±5.267 µg GAE/mg 62.86 ±8.428 µg GAE/mg	 775.41 ±5.940 µg KE/mg 400.015 ±8.153 µg KE/mg	Bu çalışmada
Zeytin -Gemlik (Etanol ekstraktı) USE SBE	Yaprak	 102.06 ±2.489 µg GAE/mg 106.93 ±2.220 µg GAE/mg	 699.535 ±13.484 µg KE/mg 465.44 ±8.060 µg KE/mg	Bu çalışmada
Zeytin (Etanol ekstraktı) (Metanol ekstraktı) (Aseton ekstraktı) (Diklorometan ekstraktı)	Yaprak	 9.81 mg GAE/mL 9.96 GAE/mL 6.92 GAE/mL 11.24 GAE/mL	 1.73 mg KE/mL 3.29 KE/mL 7.18 KE/mL 8.52 KE/mL	Bektay, Güler, Gökçe ve Kızıltaş, 2021
Zeytin -Domat (Su ekstraktı)	Yaprak	98.85±2.16 µg GAE/g	06.74±0.6 µg KE/mg	Orak, Selen İşbilir ve Yağar, 2012b
Zeytin -Gemlik (Su ekstraktı)	Yaprak	86.76±3.29 µg GAE/g,	06.76±0.02 µg KE/mg	Orak, Selen İşbilir ve Yağar, 2012b
Tetra (Etanol ekstraktı) USE SBE	Yaprak	 255.69 ± 7.828 µg GAE/mg 222.25 ± 8.436 µg GAE/mg	 161.56 ±6.090 µg KE/mg 160.42 ±7.205 µg KE/mg	Bu çalışmada
Tetra (Su ekstraktı)	Yaprak	7.05±0.19 mM/KE	-	Ivanova vd., 2005
Tetra (Su ekstraktı) (Etanol ekstraktı) (Aseton ekstraktı)	Yaprak	 199.07±0.044 GAE mg/g 176±0.025 mg GAE/g 180.61 ±0.008 GAE mg/g	-	 Bektaş, 2011
Tetra (Metanol ekstraktı)	Yaprak	3.78 ± 0.19 mg GAE/g	8.29 ± 0.37 mg RE/g	Matic vd., 2013

Özellikle ellajik asit içeren ve iyi bir antioksidan kaynağı olan nar endüstriyel bir tarım ürünüdür ve atık kısımları da antioksidan bileşenler açısından zengindir. Tehranifar vd. İran'da yetiştirilen 20 nar çeşidinin kabuk, yaprak ve tohumlarından elde edilen su ve metanol

ektraktlarının DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitelerini, antifungal ve fizikokimyasal özellikleri incelenmişlerdir (Tehranifar, Selahvarzi, Kharrazi ve Bakhsh, 2011). Nar ekstraktlarının yüksek antioksidatif özellik gösterdiğini ve metanolik kabuk ekstraktının en yüksek fenolik madde ve DPPH giderme gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, Hicaz türü nar kabuğunu da içeren dört tür nar kabuğu etanol ekstraktının toplam fenolik miktarı 132.3 ±0.40 – 160.82 ±1.50 µg GAE/g olarak, flavonoid miktarı ise 12.83±0.10 – 17.27±0.06 µg KE/mg olarak tayin edilmiştir. Hicaz nar kabuğu etanol ekstraktının ekstraksiyon verimi %50.07 ve DPPH radikal giderme aktivitesi EC_{50}= 0.091 mg/mL olarak rapor edilmiştir (Orak, Yağar ve İşbilir, 2012a). Benzer şekilde Bhagwa türü nar kabuğu ekstraktının ekstraksiyon verimi %42.45, toplam fenolik miktarı 354.67 mg GAE/g olarak tespit edilmiş, DPPH radikal giderme aktivitesinin yüksek (%94.78) olduğu belirtilmiştir (Foujdar, Bera ve Chopra, 2019).

Tetra yaprağı üzerine yapılan çalışmaların birinde Bulgaristan'da yetişen tetra bitkisinin antioksidan kapasitesi araştırılmış ve TEAC değeri 923.33 ± 14.19 µM ve fenolik içeriği 7.05 ± 0.19 mM/KE olarak rapor edilmiştir (Ivanova vd., 2005). Rusya'da yetişen tetra yaprağı alkol ekstraktının çeşitli antioksidan aktivite tayin metodlarıyla (ABTS, ORAC, DPPH, FRAP, TEAC metodları) yapılan çalışmasında yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Sukhikh vd., 2021). Kırklareli bölgesinde yetişen tetra yaprağının toplam fenolik madde miktarı su ekstraktı için 199.07±0.04 mg GAE/g ve etanol ekstraktı için 176±0.025 mg GAE/g olarak tayin edilmiştir. Su ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitesi (EC_{50}= 23.8 µg/mL) iken, etanol ekstraktının DPPH radikal giderme aktivitesi (EC_{50}= 21.7 µg/mL) olarak bulunmuştur (Bektaş, 2011).

Sunulan çalışmada da Hicaz türü nar kabuğu, tetra yaprağı, zeytin yapraklarının literatürle benzer şekilde antioksidan özelliğe sahip oldukları ve DPPH ve ABTS radikal giderme aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Örneklerin antioksidan aktiviteleri (EC_{50} değerleri) kıyaslandığında DPPH metodunda Tetra-USE > Tetra-SBE > Hicaz-USE > Hicaz-SBE > Domat-USE > Gemlik-USE > Gemlik-SBE > Domat-SBE sıralaması; ABTS metodunda Tetra-USE > Tetra-SBE > Hicaz-USE > Gemlik-USE ≥ Gemlik-SBE > Hicaz-SBE > Domat-SBE > Domat-USE olarak sıralanmaktadır. Bitki örneği veya kimyasal bir bileşiğin antioksidan aktivitesini değerlendirmek üzere çok sayıda metod bulunmaktadır. Antioksidan kapasiteyi

ölçmek için kullanılan $ABTS^{+\bullet}$ ve $DPPH^{\bullet}$ giderme metodları, antioksidan etkili örnekten radikale bir elektron transferine dayanan kimyasal temelli testler olduklarından, ekstraktların gösterdikleri aktiviteler benzer sıralamadadır. Çalışılan bitkisel materyallerden en etkilisinin en yüksek toplam fenolik içeriğine sahip olan tetra yaprağı ve nar kabuğu olduğu görülmektedir.

Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteleri içerdikleri ikincil metabolitlere ve fitobileşenlerine atfedilmektedir. Antioksidan aktivitenin de bitki ve meyvelerin içerdiği fenolik bileşiklere bağlı olduğu bilinmektedir. Atık ürün olarak değerlendirilen bu çalışmadaki bitkilerin fenolik bileşen türü ve dağılımları analizlendiğinde tetra yaprağında en fazla verbaskosit, gallik asit, protokateşik asit, mirisetin, etil gallat ve şiringik asit; zeytin yapraklarında oleuropein başta olmak üzere klorojenik asit, verbaskosit, tirozinol, rutin, protokateşik asit, lütolein, 2,5-dihidroksibenzoik asit; Hicaz türü nar kabuğunda ise ellajik asit başta olmak üzere absisik asit, etil gallat, gallik asit, kateşin, epikateşin, kersetin, florizin, mirisetin, kamferol, isoramnetin, p-kumarik asit bileşenleri bulunmuştur.

Al Azzawie ve Alhamdani zeytin yaprağı etanol ekstraktlarının fenolik bileşenlerinden biri olan oleuropeinin antioksidan ve hipoglisemik etkilerini alloksan kaynaklı diyabetik tavşan modelinde incelenmiş, oleuropeinin diyabet ve hipoglisemiyi engellemede faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006). Yapılan bir diğer çalışmada zeytin yaprak ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal etkisi, zeytin yaprağında en fazla bulunan fenolik bileşiklerden oleuropein ile ilişkilendirilmiştir (Bayram vd., 2020). Ultrasonik destekli ektraksiyon (UAE) ile elde edilen yedi tür zeytin yaprağının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesine dair İspanya'da yapılan çalışmada; ekstraktların içerdiği verbaskosit ve oleuropein başta olmak üzere toplam fenolik bileşenleri ile DPPH, ABTS ve FRAP testleri arasında güçlü korelasyon bulunmuştur. Ayrıca zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu ultrasonik prob kullanılarak ve ultrasonik su banyosu kullanılarak yapılmış, iki uygulamanın sonuçları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı bildirilmiştir (Martin-Garcia vd., 2022).

Westenburg vd. tarafından yapılan bir çalışmada *C. coggygria* bitkisinin esansiyel yağ içeriği NMR ve kütle spektrofotometresi ile ayrıştırıldığında fenolik madde içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin yapısında disülfuretin, sülfüretin, sülfürein, gallik asit, metil

gallat, pentagalloil glukoz gibi antioksidan bileşikler bulunduğu ve *C. coggygria* bitkisinin sahip olduğu bu kimyasal bileşiklerden dolayı antibakteriyel özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Westenburg vd., 2000). Matic vd. yaptıkları çalışmada, hepatotoksik bileşik pirogallole maruz kalan sıçanlarda *Cotinus coggygria* Scop'un metanol ekstraktının hepatoprotektif etkisini araştırmışlardır. HPLC ile analiz edilen *C. coggygria*'nın metanol ekstraktındaki fenolik asitlerin ve flavonoidlerin ana bileşeninin mirisetin olduğu; ekstrakt ve mirisetinin serum enzimleri AST, ALT, ALP ve toplam bilirubin üzerinde pirogallol kaynaklı yükselmeyi önemli ölçüde azaltarak hepatik fonksiyonun restorasyonunu desteklediği belirtilmiştir (Matic vd., 2013). Bu çalışmada da mirisetin flavonoidi tetra bitkisindeki ana bileşenlerden biri olarak belirlenmiş olup, tetra ekstraktının gösterdiği aktiviteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Nar kabuğu atık bir ürün olmasına rağmen zengin fenolik içeriği nedeniyle kullanım alanı bulabilmektedir. Nar suyu, meyve ve kabuğunun gösterdiği biyolojik aktiviteleri içerdikleri fenolik bileşenler ile ilişkilidir. Ancak nar çeşitlerinin ve kısımlarının içerdiği fenolik profilleri ve konsantrasyonları farklı coğrafi koşullarda yetiştirilmesine göre değişiklik göstermektedir (Elfalleh vd., 2011; Ma, Wang, Li, Ding ve Gao, 2015; Rosas-Burgos vd., 2017). Hindistan'da yetişen Bhagwa türü nar kabuğunda (Foujdar, Bera ve Chopra, 2019) ve Çin'de yetişen altı tür nar kabuğunda (Yan vd., 2017) ana bileşenin punicalagin, Kaliforniya'da yetişen nar kabuğunda major bileşenin gallik asit ve kamferol-3-O-glukozid (Ambigaipalan, de Camargo ve Shahidi, 2016) olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise Hicaz türü nar kabuğunda ellajik asit ana bileşen olarak belirlenmiştir. Yeni yapılan bir çalışmada Çin'de yetişen nar kabuğunda üçü ilk kez tanımlanan (pomegranatin A-C olarak isimlendirilmiş) 10 polifenolik bileşen izole edilmiş ve hepsinin değişen oranlarda antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Ruan vd., 2022). Bu çalışmalara göre nar kabuğu, narın fenolik bileşen ve biyolojik aktivite açısından değerli bir kısmını oluşturmaktadır.

Antioksidanların veya ilaç olma potansiyeli taşıyan bileşiklerin çeşitli in vitro veya in vivo testler ile biyomoleküllerin oksidasyonu üzerindeki koruyucu etkileri ve hücreler üzerinde antiproliferatif/sitotoksik etkileri araştırılmaktadır. Hücre canlılığı ve sitotoksisiteyi belirlemek üzere günümüzde en yaygın kullanılan in vitro testlerden birisi MTT testidir. Bu çalışmada doğal antioksidan kaynağı olabilecek nar kabuğu, tetra ve zeytin yapraklarının hücre canlılığını artırma

ve sitotoksik etkilerinin araştırılması için sağlıklı karaciğer hücre hattı olarak AML12 ve kanserli karaciğer hücre hattı olarak Hep3B hücreleri kullanılarak MTT testi uygulandı.

Literatürdeki çalışmalara göre nar kabuğu, meyvesi ve suyu kolon kanser hücresi (Seeram vd., 2005), HeLa ve REF kanser hücreleri (Saad vd., 2010), insan mide kanseri AGS hücreleri (Chauhan vd., 2011), MCF-7 meme kanseri hücreleri (Banerjee vd., 2012; Ruan vd., 2022), nazofaringel karsinom hücreleri (Hassabou ve Kamel, 2017), A549 akciğer kanseri hücreleri (Ruan vd., 2022) gibi farklı kanser türlerine ait hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Nar polifenolik ekstresinin oral kanser hücrelerinde antikanser etkisi ve mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkisi nadiren araştırılmış olmakla beraber, yakın zamanda yapılan bir çalışmada insan ağız kanseri (Ca9-22, HSC-3 ve OC-2) hücrelerine karşı narın polifenolik bileşenlerce zengin ekstresinin proliferasyon modülasyon fonksiyonu ve mekanizması değerlendirilmiştir. Nar polifenolik ekstresinin, mitokondriyal bozulma mekanizmaları yoluyla oral kanser hücrelerinin antiproliferasyonu ve apoptozunu sağladığı belirtilmiştir (Peng vd., 2021). Satın alınan nar kabuğu ekstraktından punicalagin saflaştırılarak antioksidan aktivite testleri ve dört tür akciğer kanser hücresi üzerinde MTT testi yapılmış; St-DNA 4-hidroksi estradiol/$CuCl_2$ ile hasar oluşturularak, punicalaginin etkisi araştırılmış ve DNA'nın oksidatif hasara uğramasını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (Aqil vd., 2012). Ancak literatür taramamıza göre Hicaz türü nar kabuğunun Hep3B kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Tez kapsamında yapılan MTT testi, onbir konsantrasyonda (0.95 - 1000 ppb) ve 24 saat ve 48 saat maruziyet süresinde çalışıldı. Ekstraktların öncelikle sağlıklı karaciğer hücreleri (AML12 hücre hattı) üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığı, sonrasında kanserli hücreler (Hep3B hücre hattı) üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığı araştırıldı. TS EN ISO 10993-5 standartındaki MTT değerlendirme kriterlerine göre hücre canlılığı %70'in altında ise çalışılan örneğin sitotoksik potansiyeli olduğu belirtilmiştir.

Hicaz türü nar kabuğu etanol ekstratının AML12 hücre hattı üzerinde koruyucu etkisinin yanında bu hücrelerin canlılığını da artırdı, Hep3B hücre hattı üzerinde zamana ve ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etki gösterdi. Mısırlı araştırmacılar da nar tohumu ve kabuk etanolik ekstraktının nasofaringel karsinoma (C666-1 hücre hattı) hücrelerinde yüksek

sitotoksik etki gösterdiğini ve sağlıklı hücreler üzerinde antiproliferatif etki göstermediğini rapor etmişlerdir (Hassabou ve Kamel, 2017). Etanolik nar kabuğu ekstraktından elde edilen punicalanin ve ellajik asidin HepG2 insan hepatoma hücrelerinin proliferasyonunu 24 saat maruziyet sonrasında %40 oranına kadar ve 48 saat maruziyet sonrasında %60'a yakın oranda engellediği bildirilmiştir. Ayrıca HepG2 hücresi için punicalaninin ellajik asitten daha etkili olduğu belirtilmiştir. L-02 normal insan karaciğer hücrelerinde değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Li vd., 2019). 2022 yılında yapılan bir çalışmada İran'da yetişen nar kabuğunun hidroalkolik ekstraktının ve ekstraktta bulunan majör bileşen ellajik asidin AGS (insan gastrik kanser hücresi) ve HDF (normal insan dermal fibroblast hücre) hatları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her iki örneğin de sağlıklı hücrede sitotoksik etkisinin olmadığı, ancak AGS hücreleri üzerinde doza bağlı olarak ellajik asidin daha fazla olmak üzere antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir (Cheshomi vd., 2022). Bu çalışmada kullanılan Türkiye'de yetişen Hicaz türü nar kabuğu diğer hücre hatları çalışmalarına benzer sonuçlar göstererek Hep3B hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki ve AML12 hücre hattı üzerinde ise hücre canlılığını artırarak literatüre katkı sağlamaktadır.

İyi bir antioksidan kaynağı olan tetra (*C. coggygria*) bitkisinin yapılan çalışmalarda antikanser özelliği de araştırılmıştır. Tetra ekstraktı çeşitli kanser türlerine ait kanser hücre hatları olan TK6, U937, U87, U251, DBTRG-05MG, A2780, MDA-MB-231, HeLa, LS174 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir (Antal vd., 2016; Savikin vd., 2009; Wang vd., 2015; Pollio vd., 2016). Rusya'da yetişen tetra yaprağı alkol ekstraktının HepG2, MCF7, A549 ve HCT116 hücre hatlarında sitotoksik etkili olduğu ve tetranın gösterdiği bu sitotoksik etkisi ile antioksidan aktivitesi arasında anlamlı korelasyon olduğunu bildirilmiştir (Sukhikh vd., 2021). HepG2 ve Hep3B herikisi de karaciğer kanseri hücre hattı olmasına rağmen, aralarında etnik köken, genetik, proteomları ve biyolojik açıdan farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca Hep3B hücreleri tümorojenik iken HepG2 hücreleri nontümorojeniktir (Qiu vd., 2014). Yaptığımız literatür taramasına göre tetranın Hep3B hücreleri üzerine antikanser etkisine dair çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmada tetra yaprağı ekstraktı Hep3B hücreleri üzerinde artan konsantrasyonla birlikte %44 oranına kadar sitotoksisite göstermiştir. 24 saatlik maruziyet sonrası sağlıklı karaciğer hücrelerine (AML12) zarar vermemiş, ancak 48 saat sonrasında düşük oranda (yaklaşık <10%) canlılık kaybına sebep olmuştur. AML12 hücre hattı üzerinde en iyi koruyucu ve Hep3B hücre hattı üzerinde en iyi sitotoksik etkiye 24 saatlik ekstrakt maruziyeti sonrasında sahip olduğu bulunmuştur. Wang vd. yaptıkları çalışmaları sonucunda *C. coggygria*

bitkisindeki aktif bileşenlerin mirisetin, fisetin, rutin ve kersetin olduğunu ve bu bileşenlerin apoptoz indüksiyonu ve glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunun engellenmesinde potansiyel terapötik modalite gösterebileceklerini belirtmişlerdir (Wang vd., 2015).

Zeytin ağacı eski çağlardan beri dünyanın birçok yerinde yetiştirilmekte olup, zeytin yapraklarının da yüksek fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi ile uzun bir kullanım geçmişi bulunmaktadır. Çeşitli coğrafyalarda yetişen zeytin yapraklarının antitümör etkileri araştırılmış ve nöroblastoma hücre çeşitlerinde (HTLA-230, IMR-32, SH-SY5Y VE SK-N-AS) (Morandi vd., 2021), glioblastoma (GB T98G) (Mutlu vd., 2021), kolorektal ve prostat kanseri (HT29 ve PC3) (Albogami ve Hassan, 2021), kronik miyelogenöz lösemi (K562) (Samet vd., 2014) hücre hatları üzerinde çalışılan ekstrakt konsantrasyonlarına ve maruziyet sürelerine bağlı olarak sitotoksik etki görülmüştür. Sunulan tezde Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen bir siyah zeytin çeşidi olan Gemlik türü ve Muğla-Aydın-İzmir civarlarında yetiştirilen bir yeşil zeytin çeşidi olan Domat türünün yaprakları ile çalışılmıştır. Gemlik türü zeytin yaprağı etanol ekstraktı Hep3B hücre hattına uygulandığında sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca en iyi sonuç veren inkübasyon zamanı 24 saat olarak belirlenmiştir. Domat türü zeytin yaprağı etanol ekstraktı ise sağlıklı karaciğer hücreleri (AML12) üzerinde her iki inkübasyon zamanında (24 saat ve 48 saat) da değişen oranlarda toksik etki göstermiştir, bununla birlikte Hep3B hücre hattı üzerinde ise 24 saat inkübasyon süresi sonunda artan konsantrasyonlarında sitotoksik etki göstermiştir. Çalışılan zeytin yaprakları arasındaki bu sitotoksik aktivite farklılığı genotip ırkı farklılığından kaynaklanabilir. Ayrıca bitkilerin gösterdikleri çok çeşitli biyolojik aktivitelerinden başta polifenolik bileşikler olmak üzere sentezledikleri ikincil metabolitleri sorumlu tutulmaktadır. Çalışılan iki zeytin yaprağı benzer fenolik bileşenleri içermekle birlikte, Gemlik türüne göre Domat türünün klorojenik asit miktarı 1.3 kat ve verbaskosit miktarı 1.6 kat daha yüksektir. Literatürde klorojenik asidin böbrek hücre karsinomu (A498 hücre hattı) üzerinde proliferasyonu baskıladığı ancak sağlıklı böbrek hücreleri (HEK293 hücre hattı) üzerinde de biraz toksik etki gösterdiği ve proliferasyon hızını düşürdüğü bildirilmiştir (Wang vd., 2019).

Mix olarak bahsedilen Hicaz, Tetra ve Domat ekstrakt karışımı 24 saatlik maruziyet sonrasında sağlıklı karaciğer hücrelerine (AML12 hücre hattı) zarar vermemiş, ancak 48 saatlik maruziyet sonrası düşük oranda toksisiteye neden olmuştur. Mix ekstraktı kanserli karaciğer hücreleri (Hep3B hücre hattı) üzerine uygulandığında, %44 oranlarına varan sitotoksik etki

göstermiştir. Hep3B hücre hattında; ekstraktların 7.9-1000 ppb konsantrasyon aralığında 24 saatlik süre sonunda tetranın %30.3-44.1 ve Hicaz+Tetra+Domat ekstraktlarından oluşan karışımın %31.8-44.6 oranlarında, 48 saatlik süre sonunda ise tetranın %23.1-40.4 ve karışımın %28.8-44.6 oranlarında (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) birbirlerine yakın sitotoksik etki göstermeleri, karışımda tetra ekstraktının etkili olduğunu işaret etmektedir. Benzer durum AML12 hücre hattı için, Hicaz nar kabuğu ve Mix (Hicaz+Tetra+Domat) ekstraktlarının sağlıklı hücreleri bir miktar çoğalttığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4), dolayısıyla bu durum sağlıklı hücreler üzerinde Mix ekstraktının hücre canlılığını artırma etkisinin nar kabuğundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Çalışılan bitkilerden elde edilen ekstraktların gösterdikleri bu etkileri, bitkilerin gösterdikleri diğer biyolojik aktivitelerinde olduğu gibi içerdikleri fenolik bileşenlerinden kaynaklanmaktadır.

Son zamanlarda doğal kaynaklı antioksidanların sitotoksik/antiproliferatif özelliklerini desteklemek üzere oksidatif hasarı engelleme ve DNA, protein, lipidlerde oluşan radikal kaynaklı hasarları önlemeleriyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Skava vd. (2016) ve Sitarek vd. (2016) iki farklı bitki ile benzer araştırmalar yapmışlardır. *Rhaponticum carthamoides* ve *Leonurus sibiricus* L. bitkilerinin sitotoksisitesi MTT testi ile araştırılmış, çalışmanın devamında Chinese hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde H_2O_2 indüklü oksidatif DNA hasarına karşı bitki ekstrelerinin koruyucu etkilerini belirlemek üzere Comet testi uygulanmıştır. Ayrıca, H_2O_2 ile inkübe edilmiş Chinese hamster ovaryum hücrelerinde antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GPx) gen ekspressiyonları da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bitki ekstraktlarının hücre içi antioksidan kapasiteyi düzenlediği, artan antioksidan gen ve protein ekspresyon seviyeleri (SOD2 ve CAT) ile oksidatif DNA hasarını onarmak ve DNA'yı lezyonlardan korumak için CHO hücrelerini uyarabildiği öne sürülmüştür (Sitarek vd., 2016; Skała vd., 2016).

Brezilya geleneksel tıbbında yara iyileştirmede kullanılan Barbatimao ağacı kabuğu ekstresinin, HPLC ile biyoaktif bileşenleri belirlenmiş ve GEMO assayi kullanılarak ekstrenin buzağı timus DNA'sı üzerinde genotoksik ve genoprotektif etkisi incelenmiştir. DNA oksidasyon seviyelerini azaltarak hücreler üzerinde in vitro genoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insan keratinosit ve fibroblast hücreleri üzerinde de genotoksisite ve sitotoksisite testleri yapılmıştır (Pellenz vd., 2018).

Aybastıer vd. üzüm çekirdeği metanol ekstraktının ve hidrolizlenmiş üzüm çekirdeği ektraktının, Fenton reaksiyonu ile oluşturulan oksidatif koşullar altında DNA üzerindeki koruyucu etkisini incelemiştir. Oksidatif hasar oluşturulmuş buzağı timus DNA'sının hasarlı bazlarından oluşan 18 ürün GC-MS/MS ile tayin edilmiştir. DNA'nın oksidatif hasarlanmasına karşı üzüm çekirdeği ekstraktı ve hidrolizlenmiş üzüm çekirdeği ekstraktlarından elde edilen toplam inhibisyon, kateşin ile elde edilen inhibisyon oranından daha yüksek iken, kateşin ve siyanidin karışımı ise iki ektrakt ile elde edilenden daha fazla koruyucu etki göstermiştir. Bununla birlikte yüksek miktarda siyanidin içeren hidrolizlenmiş üzüm çekirdeği ektraktı, Fenton reaksiyonu gerşekleşen kontrole kıyasla oksidatif DNA hasar ürünlerinin oluşumunu yaklaşık %53 oranında inhibe etmiştir (Aybastıer, Dawbaa ve Demir, 2018a).

Bir diğer çalışmada kekik suyu ve kekik yağının malignant akciğer hücrelerinde (A549) H_2O_2 indüklü DNA hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada bitki kaynaklı örneklerin oksidatif kaynaklı DNA hasarına bağlı hastalıklarda, önleyici rolü olduğu düşünülmüştür. Ancak, çalışmadan elde edilen hücre kültürü ortamı deneyleri *in vitro* araştırmalar olduğu için, insan sağlığı üzerindeki etkilerin netleştirilmesi açısında *in vivo* çalışmalarla daha fazla araştırılması gerekliliği de belirtilmiştir (Aybastıer vd., 2018b). Aynı araştırmacı timus DNA'sı üzerinde Fenton reaksiyonuyla oluşturduğu oksidatif hasara karşı andızotu (*Inula helenium*) kökü ve bunun majör bileşenleri olan ferulik asit ile klorojenik asidin etkilerini araştırmıştır. Oksidatif etkiyle oluşan onsekiz hasarlı baz ürünü GC-MS/MS ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlara göre DNA baz hasarını 50 µM ferulik asit %84, 50 µM klorojenik asit %66 ve ekstrakt ise %64 oranında azaltmıştır (Aybastıer, 2021).

Başka bir çalışmada buzağı timus DNA'sı $CrCl_3/H_2O_2$ ile inkübe edilerek 8OH-dG oluşumu sağlanmış; melatonin ve pinolinin DNA'yı bu oksidatif hasardan koruma özelliği incelenmiştir (Qi vd., 2000). Benzer şekilde, çalışmamızda buzağı timus DNA'sı üzerinde Fenton reaksiyonunda oluşan hidroksil radikalinin saldırısıyla 8OH-dG oluşumu sağlanmış ve nar kabuğu, tetra ve zeytin yapraklarının bu DNA hasar ürününün engellenmesi üzerine etkileri incelenmiştir ve özellikle nar kabuğu ve tetra yaprağının etkili olduğu görülmüştür.

Yüksek çalışmasında, *in vitro* insan mononükleer lökositlerde, tek hücreli jel elektroforez yöntemi ile oksidatif DNA hasarına karşı çörekotu sulu ekstraktının (ÇOE) koruyu etkisini

araştırmıştır. Çalışma sonucunda, çörekotu ekstraktının 10 mM ve 50 mM H_2O_2 tarafından oluşturulan DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı fakat ortadan kaldırmadığı bildirilmiştir (Yüksek, 2011).

Serçe vd. tarafından yapılan çalışmada, süt devedikeni (*Silybum marianum*) tohum etanol ekstraktı kullanılarak, in vitro olarak antioksidatif, oksidatif DNA, protein ve lipid hasarına karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırmacılar süt devedikeni tohumların etanol ekstraktının besin takviyesi olarak kullanılabileceğini ve DNA'yı hasardan koruyabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, *Silybum marianum* tohum ekstraktının hidroksil radikalinin neden olduğu protein, lipid ve DNA hasarını engellemede, karaciğer koruyucu ve kanserden koruyucu etkilerinden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (Serçe vd., 2016).

Dawbaa vd. tarafından yapılan bir çalışmada, *Vitis vinifera* (var. alphonse) dallarının ekstraktının antioksidan aktivitesi ve DNA hasarı önleme ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmalarında, GC-MS/MS analizi ile on sekiz DNA oksidasyon ürünü ölçülmüştür. Ekstraktın eklenmesiyle oksidatif DNA baz hasar ürünlerinin oluşumunun antioksidan güçlere sahip rutin ve izokersitrin antioksidanları tarafından azaltıldığı bildirilmiştir (Dawbaa vd., 2017).

Bitkilere ilaveten mikroorganizmalar ve algler de doğal bileşen ve ikincil metabolit kaynağıdırlar. Yapılan bir çalışmada, *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginden elde edilen ekstrakt doğal lutein ve neoksantin kaynağı kabul edilmiş ve lutein, neoksantin ve *C. reinhardtii* ekstraktının Fenton reaksiyonu ile oluşturulan DNA hasarını önleme yeteneğini araştırılmıştır. Hasarlı baz ürünleri GC-MS/MS kullanılarak analiz edilmiştir. Lutein ve neoksantin oksidatif olarak indüklenen DNA baz hasarını yarıya yakın oranda engellerken, *C. reinhardtii* ekstraktı kontrole kıyasla hasarın yaklaşık %76'sını engellemiştir. Ayrıca neoksantinin luteinden daha iyi etki gösterdiği bildirilmiştir (Şahin vd., 2020).

Tezde sözü geçen örneklerden zeytin yaprağı ile ilgili olarak yapılan bir in vivo çalışmada, sıçanlarda deneysel diyabet oluşturulmuş ve zeytin yaprağı ekstraktının hipoglisemik, antioksidan, karaciğer koruyucu ve oksidatif DNA hasarına karşı etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Sıçan serumlarında DNA hasarı göstergesi olan 8OH-dG miktarları ELISA testi ile tespit edilmiştir. Zeytin yaprağının diyabetik sıçanlarda α-amilaz ve α-glukozidaz

inhibisyonunu vasıtasıyla kan glukoz düzeyi kontrolünde etkili olduğu ve oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Temiz, 2016).

Zeytinyağı ve zeytin yapraklarında bulunan ana bileşenler oleuropein ve hidroksitirozol çeşitli radikalleri süpürücü aktiviteye sahiptirler. Bu fenolik bileşiklerin insan periferik kan lenfositlerinde hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif DNA hasarına karşı umut verici genoprotektif özellikleri olduğu belirtilmiştir. Hidroksitirozolun H_2O_2'nin neden olduğu DNA hasarına karşı oleuropeinden daha iyi koruyucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Zoric vd., 2021). Benzer bir araştırmada, zeytinyağı fenollerinin insan periferik kan mononükleer hücrelerinde ve promyelositik lösemi hücrelerinde, H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkisi tek hücreli jel elektroforez metodu kullanarak araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada zeytinyağının içerdiği fenollerin DNA hasarına karşı önleyici aktivite göstererek, kanserin önlenmesinde olası bir rolü olduğu bildirilmiştir (Fabiani vd., 2008).

Cabarkapa vd. sağlıklı kişilerden alınan lökositler üzerinde adrenalin indüklü DNA hasarında kuru zeytin yaprağı ekstraktının etkisini Comet testi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında üç konsantrasyonda (0.125, 0.5 ve 1 mg/mL) denenen ekstraktın, sadece adrenaline maruz kalan lökositlere göre hücrelerdeki DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir. (Cabarkapa vd., 2014). Aynı grup polifenolce zengin kuru zeytin yaprağı ekstraktının DNA hasarı üzerindeki etkisini, kurşuna maruz kalan işçilerin lenfositlerinde $CaNa_2EDTA$ ile şelasyon tedavisinden önce ve sonra ex vivo olarak araştırmışlardır. Şelasyonun oksidatif DNA hasarı üzerinde ekstraktın etkisine ek bir avantaj sağlamadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, sağlıklı deneklerden oluşan kontrol grubuna göre, test edilen konsantrasyondaki ekstraktın antioksidan etkisinden ziyade prooksidan etkisine işaret eden DNA hasarında bir artış olduğu belirtilmiştir (Cabarkapa vd., 2017). Burja vd. ise bu çalışmanın aksine, zeytin yaprağı ekstresinin proinflamatuvar aktivasyonu azaltabileceğini veya önleyebileceğini, MMP2 ekspresyonunun modülasyonu yoluyla vasküler yeniden şekillenmeyi etkileyebileceğini ve koroner arter endotelinde DNA hasarını önleyebilecek çoklu koruyucu eylemler sergilediğini belirtmektedir (Burja vd., 2019).

Bu konuda nar ile yapılan çalışmalarda, Derik türü nar kabuğu ve suyunun toplam fenolik içeriği belirlenmiş ve Fenton reaksiyonunun neden olduğu DNA hasarına karşı narın koruyucu

özelliği jel elektroforez yöntemi ile araştırılmıştır (Toptancı, 2018). Bu araştırmada Derik türü nar suyunun ve kabuğunun çalışmamızla benzer şekilde oksidatif DNA hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda Hicaz türü nar kabuğunun, buzağı timus DNA'sı üzerinde hidroksil radikali ile oluşturulan oksidatif hasara karşı olası etkisi LC-MS/MS ile 8-OH-2dG miktarları ölçülerek araştırılmış ve hasarı önlemede etkili olduğu görülmüştür.

Bouasla vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada nar suyunun, sodyum florür ile zehirlenen sıçanların karaciğer dokusu ve eritrositlerindeki oksidatif hasarlar üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış, sodyum florürün dokularda oksidatif hasarı indükleme potansiyel etkilerini ve nar suyunun NaF'ın oluşturduğu oksidatif hasarını azaltmada yetenekli olduğu gösterilmiştir (Bouasla vd., 2016).

Nar çeşitli kültürlerde geleneksel tıpta ve halk arasında sıklıkla kullanılan bir meyvedir, ancak kök, kabuk gibi kısımları içerdiği alkaloitlerden dolayı toksisite gösterebilir. Buradan hareketle Sanchez-Lamar vd., olgun ve bütün nar meyvesinden aldıkları etanol ekstraktının olası genotoksisitesini araştırmışlardır (Sanchez-Lamar vd., 2008). Bunun için farklı ekspressiyon seviyelerinde DNA hasarını tespit eden farklı *in vitro* ve *in vivo* genetik testler kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre bu hidroalkolik bütün nar ekstraktının genotoksik olduğunu ve 70 mg/kg dozundan fazla olduğunda fareler için genotoksik etki göstereceğini bildirmişlerdir. Bunula birlikte fareler için 0.4-7 mg/kg dozun toksik olmadığını belirterek, bütün narın genotoksik riskinin ileri çalışmalarla da araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Tetra bitkisine dair, MCF7 (meme kanseri) hücrelerinde ekstraktın antitümör aktivitesinin olası moleküler mekanizmaları ve hedefleri araştırılmıştır. MCF7 hücrelerinde *C. coggygria* ekstraktının S fazı hücre döngüsü durmasına neden olduğunu ve apoptozu tetiklediği, koloni oluşumunu azalttığını, DNA hasarını indüklediğini, hücresel termodinamik parametreleri etkilediğini bildirilmiştir (Gospodinova vd., 2020).

Cotinus coggygria Scop. metanol ekstraktının DNA üzerinde koruyucu potansiyelini incelemek üzere Wistar sıçanlarda pirogallol ile hepatik oksidatif stres oluşturulmuş ve ekstrakt pirogallol uygulamasından 2 saat ve 12 saat önce sıçanlara verilmiştir. Deneyde tiyobarbitürik asit reaktif maddeler, aspartat aminotransferaz /alanin aminotransferaz enzimleri, antioksidan enzimler, akut faz proteinleri ve Comet testi ile DNA hasarı tayin edilmiştir. Çalışma sonucuna

göre in vivo ortamda tetra ekstraktı oksidatif DNA hasarını önlemiştir (Matic vd., 2011). Matic ve ark. daha sonra yaptıkları bir çalışmalarında da *C. coggygria* ekstraktının içerdiği mirisetin fenolik bileşiğinin karaciğerdeki DNA hasarının azalmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir (Matic vd., 2013).

Tez kapsamında ultrasonik destekli ekstraksiyon ile hazırlanan tetra yaprak ekstraktının, Domat ve Gemlik türü zeytin yaprakları ekstraktlarının, Hicaz türü nar kabuğu ekstraktının ve tetra yaprağı+Hicaz nar kabuğu+Domat zeytin yaprağından oluşan Mix ekstraktının Fenton reaksiyonu ile in vitro şartlarda oluşturulan oksidatif hasara karşı DNA'yı koruma yetenekleri araştırılmıştır. Bu amaçla, oksidatif stres meydana geldiğinde öncelikle oluşan ve DNA hasar belirteci olarak kabul gören 8-OH-2dG miktarı LC-MS/MS ile ölçülmüştür. Ekstraktların etkisi iki konsantrasyonda (0.5 mg/mL ve 1 mg/mL) çalışıldı ve konsantrasyon artışıyla literatür ile uyumlu olarak DNA oksidatif hasarını önleme etkileri de arttı. En düşük 8-OH-2dG miktarları tetra ve nar kabuğu ekstraktlarında belirlendi. DPPH ve ABTS testlerinde en düşük EC_{50} değerlerini veren örnek, yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olan tetra ekstraktıdır. Tetra ekstraktının en iyi DNA oksidasyonu önleyici örnek olması, DPPH ve ABTS serbest radikalleri gidermesi ve dolayısıyla Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikallerini de yok etmesiyle ilişkilendirilebilir. Kersetin ve ellajik asidin sinerjestik etki göstererek antikarsinojenik özelliklerinin arttığı bildirilmiştir (Mertens-Talcott, Talcott ve Percival, 2003). Örneklerin fenolik bileşenleri incelendiğinde kersetin tüm örneklerde değişen miktarlarda bulunmasına karşın ellajik asit sadece nar kabuğunda ve yüksek oranda bulunmaktadır. Nar kabuğunun DNA üzerinde gösterdiği güçlü koruyucu etki kersetin ve ellajik asit sinerjizminden kaynaklanıyor olabilir. Domat ve Gemlik zeytin yaprağı ekstraktı eklenen tüplerde Fenton reaksiyonu oluşturularak DNA'nın zarar gördüğü kontrol tüpüne göre düşük miktarlarda 8-OH-2dG tayin edildi. Ancak bu ekstraktların DNA üzerinde koruyucu etkileri tetra yaprağı ve nar kabuğu örneklerine göre düşüktü. Dolayısıyla üç ekstraktın eşit oranlarda karışımından oluşan Mix örneğinin gösterdiği aktivite büyük oranda içerdiği tetra yaprağı ve Hicaz nar kabuğundan kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.18'de tez kapsamında çalışılan bitkilerin ve literatürde çalışılan benzer bitkilerin, farklı metodlar kullanılarak yapılan ölçümleri sonucu DNA hasarı üzerinde belirlenen etkileri görülmektedir.

Çizelge 4.18. Tezde çalışılan bitki ekstraktlarının oksidatif DNA hasarı üzerine olan etkilerinin literatür ile karşılaştırılması

Örnek türü	Bitki kısmı	DNA hasarı üzerine etki	Hasar ölçüm metodu	Kaynak
Zeytin -Gemlik (Etanol ekstraktı)	Yaprak	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	LC-MS/MS	Bu çalışmada
Zeytin -Domat (Etanol ekstraktı)	Yaprak	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	LC-MS/MS	Bu çalışmada
Tetra (Etanol ekstraktı)	Yaprak	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	LC-MS/MS	Bu çalışmada
Nar-Hicaz (Etanol ekstraktı)	Kabuk	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	LC-MS/MS	Bu çalışmada
Andızotu (*Inula helenium*)	Kökü	Baz hasarını azaltıcı etki (buzağı timus DNA)	GC-MS/MS	Aybastıer, 2021
Chlamydomonas reinhardtii (Etanol ekstraktı)	Mikroalg	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	GC-MS/MS	Şahin vd., 2020
Üzüm (Metanol ekstraktı)	Çekirdek	Koruyucu etki (buzağı timus DNA)	GC-MS/MS	Aybastıer, Dawbaa ve Demir, 2018a
Kekik (Su ekstraktı, Metanol-Su ekstraktı)	Suyu Yağı	Koruyucu etki (buzağı timus DNA)	GC-MS/MS	Aybastıer vd., 2018b
Barbatimao ağacı (Etanol ekstraktı)	Kabuk	Geno-koruyucu etki (buzağı timus DNA)	GEMO testi	Pellenz vd., 2018
Nar-Derik (Etanol ekstraktı)	Suyu Kabuk	Koruyucu etki (plazmid DNA)	Jel elektroforez	Toptancı, 2018
Vitis vinifera (var. alphonse) (Etanol – su ekstraktı)	Dal	Önleme etkisi (buzağı timus DNA)	GC-MS/MS	Dawbaa vd., 2017
Zeytin (Su ekstraktı)	Yaprak	Koruyucu etki (in vivo–sıçan)	ELISA	Temiz, 2016
Tetra (Metilen klorür/metanol ekstraktı)	Öz odun	Koruyucu etki (periferik insan lenfosit)	Sitokinez-blok mikronükleus testi	Milosavljevic vd., 2021
Zeytin	Oleuropein, Hidroksitirozol	Koruyucu etki (insan periferik kan lenfositleri)	Comet testi	Zoric vd., 2021
Zeytin (Etanol ekstraktı)	Kuru OLE EFLA® 943	Koruyucu eylemler (endotel hücre kültürleri)	Comet testi	Burja vd., 2019
Zeytin (Etanol ekstraktı)	Kuru OLE EFLA® R943	Hasarı hafifletme etkisi (insan periferik kan hücreleri)	Comet testi	Topalovic vd., 2018
Rhaponticum carthamoides (n-hekzan ile sulu metanol ekstraktı)	Kök	Koruyucu etki (Çin hamsteri yumurtalık hücreleri-CHO)	Comet testi	Skala vd., 2016
Leonurus sibiricus L. (Sulu metanol ekstraktı)	Toprak üstü kısımlar ve	Koruyucu etki (Çin hamsteri	Comet testi	Sitarek vd. 2016

	kök	yumurtalık hücreleri)		
Süt devedikeni (*Silybum marianum)* (Petrol eteri ile etanol ekstraktı)	Tohum	Koruyucu etki (Plazmid DNA)	Elektroforez	Serçe vd., 2016
Zeytin	Kuru OLE EFLA® 943	Hasarı azaltıcı etki (Lökositler)	Comet testi	Cabarkapa vd., 2014
Tetra (Metanol ekstraktı)	Yaprak	DNA hasarını azalttıcı etki (in vivo- sıçan)	Comet testi	Matic vd., 2013
Çörek otu (Sulu ekstraktı)		Koruyucu etki (insan mononükleer lökositler)	Tek hücreli jel elektroforezi	Yüksek, 2011
Zeytin (Metanol ekstraktı) (Metanol/su ekstraktı)	Yağı ve zeytin değirmenin atık suyu	Önleyici aktivite (insan periferik kan mononükleer hücreler)	Tek hücreli jel elektroforezi	Fabiani vd., 2008

Tez kapsamında çalışılan örneklerden en etkilisinin yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olan tetra yaprakları ve nar kabuğunun olduğu görülmektedir. Kabuğu narın fenolik bileşen açısından değerli bir kısmını oluşturmaktadır, bu sebeple nar kabuğunun fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanımı desteklenmelidir. Benzer şekilde tetra yaprağı da çeşitli biyolojik aktivitelere sahip, potansiyel bir antioksidan kaynağıdır. Geniş bir yetiştirilme alanı olan zeytin ağaçlarının yaprakları polifenolik bileşenleri sayesinde ekonomiye kazandırılarak, sözü geçen bu bitkisel materyaller kozmetik, gıda gibi sektörlerde kullanım alanı bulabilirler. Özellikle antikanser ve ilaç araştırmalarında kaynak olarak önem teşkil etmektedirler. Bununla birlikte tayin edilen bu aktivitelerin in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bitkisel kaynakların iklime, toprağa ve mevsime olan bağlılıkları ve bunun sonucu olarak fitobileşen içeriklerinde meydana gelebilecek değişiklikler, genotip farklılıkları gibi etkenler yapılan çalışmaların çeşitlenmesi gerekliliğini de doğurmaktadır.

KAYNAKLAR

Akkuş, İ. (1995). *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Yayınları.

Akyüz, E. (2010). Bazı Anthemıs Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Gazi Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Akyüz, E. (2007). *Polygonum bistorta* ssp. carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri (Yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Al-Azzawie, H.F. & Alhamdani, M.S.S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, *78*(12), 1371-1377. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.029

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4. Baskı). New York: Garland Science.

Ali, U. & Kumar, P. (2015). Effect of Soxhlet and ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract. *Internatıonal Journal of Food and Nutritional Sciences*, *3*(6), 265-270.

Ambigaipalan, P., De Camargo, A.C. & Shahidi, F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6584-6604. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950

Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A. & Kremastinos, D. T. (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *Journal of Nutrition*, *136*(8), 2213-2219. https://doi.org/10.1093/jn/136.8.2213

Angiolella, L., Sacchetti, G. & Efferth, T. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of natural compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID:1945179. https://doi.org/10.1155/2018/1945179

Annegowda, H. V., Mordi, M. N., Ramanathan, S., Hamdan, M. R. & Mansor, S. M. (2011). Effect of extraction techniques on phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC determination of antioxidants. *Food Analytical Methods*, *5*(2), 226-233. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9228-y

Antal, D., Ardelean, F., Pinzaru, I., Borcan, F., Ledeti, I., Coricovac, D., Zupko, I., Baghdikian, B., Ollivier, E., Soica, C. & Bolintineanu, S.L. (2016). Effects of cyclodextrin complexation on the anti-cancer effects of *Cotinus coggygria* extract and its constituents, butein and sulfuretin. *Revista de Chimie*, *67*(8), 1618-1622.

Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J. & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*, *49*(1), 345–353. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059

Atmaca, E. & Aksoy, A. (2009). Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit

edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 20*(2), 79-83.
Aybastıer, Ö. (2021). Efficacy of methanol-water extract of *Inula helenium* root against oxidative DNA damage. *Journal of Traditional Chinese Medicine, 41*(2), 293-300.
Aybastıer, Ö., Dawbaa, S., Demir, C., Akgün, O., Ulukaya, E. & Arı, F. (2018b). Quantification of DNA damage products by gas chromatography tandem mass spectrometry in lung cell lines and prevention effect of thyme antioxidants on oxidative induced DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *808*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2018.01.004
Aybastıer, Ö., Dawbaa, S. & Demir, C. (2018a). Investigation of antioxidant ability of grape seeds extract to prevent oxidatively induced DNA damage by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1072*, 328-335. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.044
Azat Aziz, M., Shehab Diab, A. & Abdulrazak Mohammed, A. (2019). Antioxidant categories and mode of action. *Antioxidants*. https://doi.org/10.5772/intechopen.83544
Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426-436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
Bakar, E., Uluçam, E., Çerkezkayabekir, A., Sanal, F. & İnan, M. (2019). Investigation of the effects of naringin on intestinal ischemia reperfusion model at the ultrastructural and biochemical level. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 109*,345-350. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.045
Ballabh, B. & Chaurasia, O. P. (2007). Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh-Used in treatment of cold, cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology*, *112*(2), 341-349. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.020
Banerjee, N., Talcott, S., Safe, S. & Mertens-Talcott, S. U. (2012). Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells in vitro and vivo: potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation. *Breast Cancer Research and Treatment*, *136*(1), 21-34. https://doi.org/10.1007/s10549-012-2224-0
Barltrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H. & Cory, J. G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)te trazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indica. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *1*(11), 611-614. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)81162-8
Bassiri-Jahromi, S. & Doostkam, A. (2019). Comparative evaluation of bioactive compounds of various cultivars of pomegranate (*Punica granatum*) in different world regions. *AIMS Agriculture and Food*, *4*(1), 41-55. https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2019.1.41
Bayram, M., Topuz, S. & Kaya, C. (2020). Zeytin yaprağı ekstraktı ve oleuropeinin antioksidan, antimikrobiyal aktivitesi, gıdalarda kullanım olanakları. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *8*(2), 337. https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i2.337-347.3039
Bektay, M. Y., Güler, E. M., Gökçe, M. & Kızıltaş, M.V. (2021). Investigation of the genotoxic, cytotoxic, apoptotic, and oxidant effects of olive leaf extracts on liver cancer cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, *18*(6), 781-789. https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.03271
Bektaş, E. (2011). *Cotinus coggygria* (Scop.) Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal

Aktivitesinin Belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, *68*(4), 457-462. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6

Berridge, M.V., Herst, P. M. & Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, *11*, 127-152. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7

Bhandari, P.R. (2012). Pomegranate (*Punica granatum* L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases, 2*(3), 171-184. https://doi.org/10.4103/2231-0738.99469.

Bıçakçı, A., Altunoğlu, M.K., Tosunoğlu, A., Çelenk, S., Canitez, Y., Malyer, H.S.N. (2009). Türkiye'de Oleaceae familyasına ait allerjenik *Olea* (Zeytin ağacı) ve Fraxinus (Dişbudak ağacı) polenlerinin havadaki dağılımları. *Asthma Allergy Immunology, 7,* 133-146.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200. https://doi.org/10.1038/1811199a0

Bouasla, A., Bouasla, I., Boumendjel, A., Abdennour, C., El Feki, A. & Messarah, M. (2016). Prophylactic effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on sodium fluoride induced oxidative damage in liver and erythrocytes of rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *94*(7), 709-718. https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0226

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F. & Nucci, R. (2002). Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, *162*(5), 791-798. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00022-5

Burçak, G. & Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, *35*(4), 159-169.

Burda, S. & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 2774-2779. https://doi.org/10.1021/jf001413m

Burja, B., Kuret, T., Janko, T., Topalovic, D., Zivkovic, L., Mrak-Poljsak, K., Spremo-Potparevic, B., Zigon, P., Distler, O., Cucnik, S., Sodin-Semrl, S., Lakota, K. & Frank-Bertoncelj, M. (2019). Olive Leaf Extract Attenuates Inflammatory Activation and DNA Damage in Human Arterial Endothelial Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *6*(56), https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00056

Butkeviciute, A., Urbstaite, R., Liaudanskas, M., Obelevicius, K. & Janulis, V. (2022). Phenolic Content and Antioxidant Activity in Fruit of the Genus *Rosa* L. *Antioxidants*, *11*(5), 912. https://doi.org/10.3390/antiox11050912

Cabarkapa, A., Dekanski, D., Zivkovic, L., Milanovic-Cabarkapa, M., Bajic, V., Topalovic, D., Giampieri, F., Gasparrini, M., Battino, M. & Spremo-Potparevic, B. (2017). Unexpected effect of dry olive leaf extract on the level of DNA damage in lymphocytes of lead intoxicated workers, before and after CaNa2EDTA chelation therapy. *Food and Chemical Toxicology*, *106*, 616-623. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.023

Cabarkapa, A., Zivkovic, L., Zukovec, D., Djelic, N., Bajic, V., Dekanski, D. & Spremo-Potparevic, B. (2014). Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicology in vitro*, *28*(3), 451-456. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.014

Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. & Ravanat, J.L. (2003). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *531*(1-2), 5-23. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001

Cadet, J. & Wagner, J. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(2). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559

Candeias, L. P. & Steenken, S. (2000). Reaction of HO$^{\bullet}$ with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)$^{\bullet}$. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, *6*(3), 475-484. https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3765(20000204)6:3<475::aid-chem475>3.0.co;2-e

Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R. & Cecchini, F. (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*, *127*(2), 493-500. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.030

Cavalcanti, R. N., Koshima, C. C., Forster-Carneiro, T., Gomes, M. T. M. S., Rostagno, M. A. Prado, J. M. & Meireles, M.A.A. (2022). Uses and applications of extracts from natural sources. Juliana M. Prado & Mauricio A Rostagno (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications içinde* (s. 1-65). London: Royal Society of Chemistry.

Chaira, N., Smaali, M. I., Martinez-Tomé, M., Mrabet, A., Murcia, M. A. & Ferchichi, A. (2009). Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water-methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *60*(Suppl.7), 316-329. https://doi.org/10.1080/09637480903124333

Chatterjee, N. & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *58*(5), 235-263. https://doi.org/10.1002/em.22087

Cheshomi, H., Bahrami, A. R., Rafatpanah, H. & Matin, M. M. (2022). The effects of ellagic acid and other pomegranate (*Punica granatum* L.) derivatives on human gastric cancer AGS cells. *Human & Experimental Toxicology*, *41*, 1-6. https://doi.org/10.1177/09603271211064534

Collins, A. (2000). Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). *Free Radical Research*, *32*(4), 333-341. https://doi.org/10.1080/10715760000300331

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroğlu, M. & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, *17*(10), 1195-1214. https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev

Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2. Baskı). Sunderland: Sinauer Associates.

Çetinkaya, Ha. & Kulak, M. (2016). Relationship between total phenolic, total flavonoid and oleuropein in different aged olive (*Olea europaea* L.) Cultivar leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *13*(2), 81. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v13i2.10

Dasgupta, A. & Klein, K. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention*

and Treatment of Disease. Elsevier Inc.

Dawbaa, S., Aybastıer, Ö. & Demir, C. (2017). Ultrasensitive determination of DNA oxidation products by gas chromatography–tandem mass spectrometry and the role of antioxidants in the prevention of oxidative damage. *Journal of Chromatography B, 1051*, 84-91. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.014

De, A., Joaquin-Ramos, J., Cesar, U., Lopez-Palestina, C.U., Pinedo-Espinoza, J., Altamirano Romo, S.E., Yair, O., Santiago Saenz, Y., Aguirre-Mancilla, C. L. & Gutierrez-Tlahque, J. (2020). Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* [Kunth] H. Rob & Brettell). *Chilean Journal of Agricultural research, 80*(3), 352-360. https://doi.org/10.4067/S0718-58392020000300352.

De Martinis, B. S. & De Lourdes Pires Bianchi, M. (2002). Methodology for urinary 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacological Research*, *46*(2), 129-131. https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00080-4

Decker, E. A., Chen, B., Panya, A. & Elias, R. J. (2010). 10 - Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods. Eric Decker, Ryan Elias, & D. Julian McClements (Eds.), *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications:Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity içinde* (s. 225-248). Cambridge: Woodhead Ltd.

Demirci, B., Demirci, F. & Baser, K. H. C. (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygria* Scop. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, *18*(1), 43-44. https://doi.org/10.1002/ffj.1149

Dikilitaş, M. & Koçyiğit, A. (2010). Canlilarda "Tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik Not): Comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *14*(2), 77-89.

Dikmen, M., Öztürk, N. & Özturk, Y. (2008). Cytotoxic and inhibitory effects of pomegranate peel extract on proliferation of MCF-7 cells. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, *37*(3), 179-190.

Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(9), 505–512. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.004

Dinçer, Y. & Kankaya, S. (2010). DNA Hasarinin Belirlenmesinde Comet Assay/Comet Assay for Determining of DNA Damage. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, *30*(4), 1365.

Dizdaroğlu, M., Jaruga, P. & Rodriguez, H. (2021). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: Comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, *29*(3), 1-8. https://doi.org/10.1093/nar/29.3.e12

Dizdaroğlu, M., Coskun, E. & Jaruga, P. (2015). Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radical Research*, *49*(5), 525-548. https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1014814

Dizdaroğlu, M. & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research, 46*(4), 382-419. https://doi.org/10.3109/10715762.2011.653969

Dizdaroğlu, M., Kirkali, G. & Jaruga, P. (2008). Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radical Biology & Medicine, 45*, 1610-1621.

Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M. & Rodriguez, H. (2002). Free Radical-Induced Damaged to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine, 32*(11), 1102-1115.

Dizdaroğlu, M., Jaruga, P. & Rodriguez, H. (2001). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Research, 29*(3). https://doi.org/10.1093/nar/29.3.e12

Dizdaroğlu, M., Laval, J. & Boiteux, S. (1993). Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosinederived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry, 32*(45), 12105-12111.

Dizdaroğlu, M., Holwitt, E., Hagan, M. & Blakely, W. (1986). Formation of cytosine glycol and 5,6- dihydroxycytosine in deoxyribonucleic acid on treatment with osmiumtetroxide. *Biochemistry, 235*, 531-536.

Dzoyem, J.P., Tchamgoue, J., Tchouankeu, J.C., Kouam, S.F., Choudhary, M.I. & Bakowsky, U. (2018). Antibacterial activity and cytotoxicity of flavonoids compounds isolated from Pseudarthria hookeri Wight & Arn. (Fabaceae). *South African Journal of Botany, 114,* 100-103.

Eddebbagh, M., Massoudi, M., Abdelmjid, A.,Berrada, M., Attaleb, M., Benbacer, L. & Bennamara, A. (2016). Correlation of the Cytotoxic and Antioxidant Activities of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum*) with Phenolic and Flavonoid Contents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4*, https://doi.org/10.17265/2328-2150/2016.09.006.

El-Baroty, G. S., Khalil, M. F. & Mostafa, S. H. A. (2014). Natural antioxidant ingredient from by-products of fruits. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, *9*(3), 311-320. https://doi.org/10.3844/ajabssp.2014.311.320

Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M. & Ferchichi, A. (2011). Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of Food Science*, *76*(5), C707-C713. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02179.x

Elgin-Cebe, G., Konyalıoğlu, S. & Zeybek, U. (2012). *Olea europaea* var. Europaea (Zeytin) yaprak infüzyonunun antioksidan etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49*(3), 209–212.

Erdoğan, S.M., Akkol, E. & Avcı, G. (2020). Research on the antioxidant efficiacy of olive (*Olea Europaea* L.) leaf using by in vitro methods. *Kocatepe Veterinary Journal, 13*(3), 319-326, doi: 10.30607/kvj.698776

Evans, M.D., Dizdaroğlu, M. & Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research, 567*(1), 1-61.

Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F. & Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *Journal of Nutrition*, *138*(8), 1411-1416. https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1411

Fan, F. & Wood, K. V. (2007). Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies*, *5*(1), 127-136. https://doi.org/10.1089/adt.2006.053

Fellah, B., Bannour, M., Rocchetti, G., Lucini, L. & Ferchichi, A. (2018). Phenolic profiling and antioxidant capacity in flowers, leaves and peels of Tunisian cultivars of *Punica granatum* L. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(9), 3606-3615. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3286-8

Ferreira, I., Barros, L. & Abreu, R. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(12), 1543-1560. https://doi.org/10.2174/092986709787909587

Forlenza, M.J. & Miller, G.E. (2006). Increased serum levels of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine in

clinical depression. *Psychosomatic Medicine, 68*(1), 1-7. doi:10.1097/01.psy.0000195780.3
Foujdar, R., Bera, M.B. & Chopra, H.K. (2019). Optimization of process variables of probe ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from the peel of *Punica granatum* Var. Bhagwa and it's chemical and bioactivity characterization. *Journal of Food Processing and Preservation, 44*(1),e14317. https://doi.org/10.1111/jfpp.14317
Furiga, A., Lonvaud-Funel, A. & Badet, C. (2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry, 113*(4), 1037-1040.
Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., Merzouki, M. & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands), 23*, e00347. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347
Goncagül, G., Güceyü, Ç. & Günaydın, E. (2020). Investigation of in-vitro antibacterial activity of *Cotinus coggygria* Scop. extracts. *Van Veterinary Journal*, *31*(3), 127-132. https://doi.org/10.36483/vanvetj.742535
Gospodinova, Z., Bózsity, N., Nikolova, M., Krasteva, M. & Zupkó, I.(2017). Antiproliferative properties against human breast, cervical and ovarian cancer cell lines, and antioxidant capacity of leaf aqueous ethanolic extract from *Cotinus coggygria* Scop. *Acta Medica Bulgarica,44*(2), 20-25. https://doi.org/10.1515/amb-2017-0014
Gospodinova, Z. I., Zupkó, I., Bózsity, N., Manova, V. I., Georgieva, M. S., Todinova, S. J. & Krasteva, M. E. (2020). *Cotinus coggygria* Scop. induces cell cycle arrest, apoptosis, genotoxic effects, thermodynamic and epigenetic events in MCF7 breast cancer cells. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *76*(3-4), 129-140. https://doi.org/10.1515/znc-2020-0087
Güleşci, N. & Aygül, I. (2016). Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, *5*(1), 109-129. https://dergipark.org.tr/tr/pub/gumussagbil/issue/23825/253821
Gürbüz, M. & Öğüt, S. (2018). Zeytin yaprağının potansiyel sağlık yararları. Potential health benefits of olive leaf. *Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences*, *3*(3), 242-253. https://doi.org/10.5336/healthsci.2017-58346
Ha, J.Y., Goo, S.Y.,Sung, J.-S. & Shin, H.-S. (2009). Antioxidant and cytoprotective activity of the olive leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) extracts on the mouse embryonic fibroblast cell. *Food Science and Biotechnology*, *18*(4), 965–970.
Habeebullah, S. F. K., Nielsen, N. S. & Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of potato peel extracts in a fish-rapeseed oil mixture and in oil-in-water emulsions. *Journal of American Oil Chemist's Society, 87*, 1319-1332.
Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology, 141*(2), 312-322. doi:10.1104/pp.106.077073
Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. London: Oxford University Press. Inc.
Halliwell, B. & Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, *281*(1-2), 9-19. https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6
Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, *186*(C), 1-85. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B

Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., Sadegh, S. E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N. Y., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M. & Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports, 38*(2), 819-828. https://doi.org/10.3892/or.2017.5766

Hassabou, N.F. & Kamel, S.M. (2017). Effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on nasopharyngeal carcinoma cell lines. *International Journal of Advanced Research, 5*(12), 748-756.

He, Q., Du, B. & Xu, B. (2018). Extraction optimization of phenolics and antioxidants from black goji berry by accelerated solvent extractor using response surface methodology. *Applied Sciences*, *8*(10), 1905. https://doi.org/10.3390/app8101905

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572-584. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L. & Katan, M.B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(12), 2379-2383. https://doi.org/10.1021/jf00024a011

Himour, S., Yahia, A. & Belattar, H. (2017). Oleuropein and antibacterial activities of *Olea europaea* L. leaf extract. *European Scientific Journal, 13*(6), 342. https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n6p342

Huang, C. (1999). *The Pharmacology of Chinese Herbs.* New York: CRC Press.

Huang, Z., Chen, Y. & Zhang, Y. (2020). Mitochondrial reactive oxygen species cause major oxidative mitochondrial DNA damages and repair pathways. *Journal of Biosciences. 45*(1),84. 10.1007/s12038-020-00055-0

Inglett, G. E., Chen, D., Berhow, M. & Lee, S. (2011). Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*, *125*(3), 923-929. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.076

Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I. & Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry, 10*(23), 2495-2505. doi:10.2174/0929867033456477

Ismandari, T., Kumalaningsih, S., Wijana, S. & Mustaniroh, S.A. (2020). Optimization of bioactive compound extraction from Rose Myrtle fruit (*Rhodomyrtus tomentosa*, (W.Ait), *Myrtaceae*) as the antioxidant source. *Scientific World Journal*, 9105847. doi: 10.1155/2020/9105847.

Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. & Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology, 96*(1-2), 145-150. doi:10.1016/j.jep.2004.08.033

Jalarama Reddy, K., Jayathilakan, K., & Pandey, M. C. (2015). Olive oil as functional component in meat and meat products: A review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(11), 6870–6878. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1852-x

Jaruga, P., Coskun, E., Kimbrough, K., Jacob, A., Johnson, W. E. & Dizdaroğlu, M. (2017). Biomarkers of oxidatively induced DNA damage in dreissenid mussels: A genotoxicity assessment tool for the Laurentian Great Lakes. *Environmental Toxicology, 32*(9), 2144-2153. doi:10.1002/tox.22427

Jaruga, P., Speina, E., Daniel, G., Tudek, B. & Olinski, R. (2000). Endogenous oxidative DNA

base modifications analysed with repair enzymes and BC/MS technique. *Nucleic Acids Research, 28*(6), 1-4.

Karaaslan, M., Vardin, H., Varlikliöz, S. & Yilmaz, F. M. (2014). Antiproliferative and antioxidant activities of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(1), 82–90. https://doi.org/10.1111/ijfs.12278

Karabulut, H. & Gülay, M.Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4*(1), 50-59.

Karadeniz, F., Burdurlu, H. S., Koca, N. & Soyer, Y. (2005). Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *29*(4), 297-303. https://doi.org/10.3906/tar-0409-12

Kasnak, C. & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *3*(5), 226. https://doi.org/10.24925/turjaf.v3i5.226-234.171

Kavaklı, I. H., Bulut, S. & Tardu, M. (2018). Kanserde DNA tamiri ve tedavide DNA tamir yolakları. Yusuf Baran, (Ed.), *Kanser Moleküler Biyolojisi içinde* (s. 173-184). İstanbul: Kısayol Yayıncılık.

Kaymaz, M.B. (2018). Yanık yarası üzerine *Cotinus Coggygria* (duman ağacı) yaprak ekstresi ve fenitoinin etkileri (Doktora tezi). İnönü Üniversitesi & Gazi Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüleri, Malatya.

Kim, D.O. & Lee, C.Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(4), 253-273. https://doi.org/10.1080/10408690490464960

Kim, S.-G., Byun, H.-D., Kim, S. C., Yang, K., Kim, J. H. & Han, J.-H. (2015). Antioxidative and Anti-inflammatory Activities of Carrot flower. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, 30* (2), 77-81. https://doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.2.77

Klaunig, J.E. & Kamendulis LM. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 44,* 239-267.

Koca, N. & Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *GIDA*, *30*(4), 229-236.

Kovacic, P., Pozos, R. S., Somanathan, R., Shangari, N. & O'Brien, P. J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure -activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(22), 2601-2623. https://doi.org/10.2174/092986705774370646

Koyuncu, I., Gönel, A., Akdağ, A. & Yilmaz, M.A. (2018). Identification of phenolic compounds, antioxidant activity and anti-cancer effects of the extract obtained from the shoots of *Ornithogalum narbonense* L. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France), 64*(1), 75-83. https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.1.14

Kulaksız, G. & Sancar, A. (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turkish Journal of Biochemistry*, *32*(3), 104-111.

Kumar, A., Pottiboyina, V. & Sevilla, M.D. (2011). Hydroxyl radical (OH•) reaction with guanine in an aqueous environment: a DFT study. *The Journal of Physical Chemistry B, 115*(50), 15129-15137. https://doi.org/10.1021/jp208841q

Kumar, S. & Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, *2013,* Article ID 162750.

https://doi.org/10.1155/2013/162750
Kurtoğlu, E.L. & Tekedereli, İ. (2015). DNA onarım mekanizmaları. *Balıkesir Health Sciences Journal, 4*(3), 169-177. https://doi.org/10.5505/bsbd.2015.52523
Kültür, S. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology, 111* (2), 341-364. doi:10.1016/j.jep.2006.11.035.
Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, *27*(4), 969-978. https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1
Lee, K.A., Kim, KT., Kim, H.J. Chung, M.S., Chang, P.S., Park, H. & Paik, H.D. (2014). Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. *Food Science and Biotechnology,* 23, 615-621 https://doi.org/10.1007/s10068-014-0084-6
Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research, 18*(1), 85-98. https://doi.org/10.1038/cr.2007.115
Li, J., Wang, G., Hou, C., Li, J., Luo, Y. & Li, B. (2019). Punicalagin and ellagic acid from pomegranate peel induce apoptosis and inhibits proliferation in human HepG2 hepatoma cells through targeting mitochondria. *Food and Agricultural Immunology*, *30*(1), 897-912. doi:10.1080/09540105.2019.1642857
Li, L.Y., Guan, Y.D., Chen, X.S., Yang, J.M. & Cheng, Y. (2021). DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 629266. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.629266
Li, T. S. C. (2009). *Chinese and Related North American Herbs Phytopharmacology and Therapeutic Values,* New York: CRC Press.
Li, Y. & Trush, M. A. (1994). Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Research, 54*(7 Suppl.), 1895s-1898s.
Lim, Y. H., Kim, I. H. & Seo, J. J. (2007). In vitro activity of kaempferol isolated from the Impatiens balsamina alone and in combination with erythromycin or clindamycin against Propionibacterium acnes. *Journal of microbiology (Seoul, Korea), 45*(5), 473-477.
Lins, P. G., Pugine, S.M.P., Scatolini, A. M. & de Melo, M. P. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon*, *4*(9), e00805. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805
Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews, 4*(8), 118-126. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902
Longo-sorbello, G., Saydam, G., Banerjee, D. & Bertino, J. (2006). Cytotoxicity and Cell Growth Assays. Julio E. Celis (Ed.), *Cell Biology içinde* (3. Baskı.) (s.315-324). Elsevier Academic Press. https://doi.org/10.1016/b978-012164730-8/50039-3
Lugasi, A., Biro, L., Hovarie, J., Sagi, K.V., Brand, S. & Barna, E. (2003). Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. *Nutrition Research, 23*(8), 1035-1044.
Ma, G.Z., Wang, C.M., Li, L., Ding, N. & Gao, X.L. (2015). Effect of pomegranate peel polyphenols on human prostate cancer PC-3 cells in vivo. *Food Science and Biotechnology, 24*(5), 1887–1892. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0247-0
Martin, J., Navas, M. J., Jimenez-Moreno, A. M. & Asuero, A. G. (2017). Anthocyanin Pigments: Importance, sample preparation and extraction. *Phenolic Compounds - Natural*

Sources, Importance and Applications içinde (s. 117-152). Rijeka: Intech. https://doi.org/10.5772/66892

Matic, S., Stanic, S., Bogojevic, D., Vidakovic, M., Grdovic, N., Arambasic, J., Dinic, S., Uskokovic, A., Poznanovic, G., Solujic, S., Mladenovic, M., Markovic, J. & Mihailovic, M. (2011). Extract of the plant C*otinus Coggygria* Scop. attenuates pyrogallol-induced hepatic oxidative stress in wistar rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *89*(7), 401-411. https://doi.org/10.1139/Y11-043

Matic, S., Stanic, S., Bogojevic, D., Vidakovic, M., Grdovic, N., Dinic, S., Solujic, S., Mladenovic, M., Stankovic, N. & Mihailovic, M. (2013). Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *755*(2), 81-89. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.011

Matic, S., Stanic, S., Mihailovic, M. & Bogojevic, D. (2016). *Cotinus coggygria* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(4), 452-461. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.05.012

Mason, P. A. & Cox, L. S. (2012). The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, *34*(6), 1317-1340. https://doi.org/10.1007/s11357-011-9306-5

McDorman, K. S., Pachkowski, B. F., Nakamura, J., Wolf, D. C. & Swenberg, J. A. (2005). Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-Biological Interactions*, *152*(2-3), 107-117. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.02.003

Menduh, B. (2015). Zeytin, Zeytin Çekirdeği ve Zeytin Yaprağındaki Oleuropein Bileşiğinin İzolasyonu ve Miktarlarının Karşılaştırılması (Yüksek lisans tezi). Balıkesir Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *15*(1), 91-96.

Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S. T., & Percival, S. S. (2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *The Journal of Nutrition*, *133*(8), 2669-2674. https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2669

Messner, K.R. & Imlay, J.A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(45), 42563-42571. https://doi.org/10.1074/jbc.M204958200

Miller, D.M., Buettner, G.R. & Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, *8*(1), 95-108. https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90148-C

Milligan, J.R. & Ward, J.F. (1994). Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by Scavenger-derived radicals. *Radiation Research*, *137*(3), 295-299. https://doi.org/10.2307/3578702

Milner, A.E., Vaughan, A.T. & Clark, I. P. (1987). Measurement of DNA damage in mammalian cells using flow cytometry. *Radiation Research*, *110*(1), 108-117.

Milosavljevic, S., Djordjevic, I., Mandic, B., Tesevic, V., Stankovic, M., Todorovic, N. & Novakovic, M. (2021). Flavonoids of the Heartwood of *Cotinus coggygria* Scop. Showing protective effect on human lymphocyte DNA. *Natural Product Communications*, *16*(12),

1934578X2110672. doi:10.1177/1934578X211067289
Mmopele, K., Combrinck, S., Hamman, J., Willers, C., Chen, W. & Viljoen, A. (2018). Potential Herb-Drug Pharmacokinetic Interactions between African wild olive leaf extract and selected antihypertensive drugs. *Planta Medica*, *84*(12-13), 886–894. https://doi.org/10.1055/a-0583-0543
Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Balan, A., Dima, L., Toma, S. I., Bigiu, N. F. & Blidaru, A. (2021). Pharmacological and therapeutic properties of *Punica granatum* phytochemicals: Possible roles in breast cancer. *Molecules*, *26*(4), 1054. doi:10.3390/molecules26041054
Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(May), 1-10.
Monaghan, P., Metcalfe, N. B. & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, *12*(1), 75-92. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x
Movileanu, I., Nunez De Gonzalez, M. T., Hafley, B., Miller, R. K. & Keeton, J. T. (2013). Comparison of dried plum puree, rosemary extract, and BHA/BHT as antioxidants in irradiated ground beef patties. *International Journal of Food Science*, https://doi.org/10.1155/2013/360732
Mülazımoğlu, İ.E. (2008). Camsı karbon elektrot yüzeyine çeşitli flavonoid türevlerinin modifikasyonu, yüzey karakterizasyonu, elektrokimyasal ve spektroskopik özelliklerinin incelenmesi (Doktora tezi). Selçuk Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
Naczk, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1-2), 95-111. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059
Naumov, S. & von Sonntag, C. (2008). The energetics of rearrangement and water elimination reactions in the radiolysis of the DNA bases in aqueous solution (eaq- and •OH attack): DFT calculations. *Radiation Research*, *169*(3), 355–363. https://doi.org/10.1667/RR1081.1
Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, *66*(7), 1022-1037.
Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K. & van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *74*(4), 418-425.
Nimse, S.B. & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, *5*(35), 27986-28006. https://doi.org/10.1039/c4ra13315c
Nizamlioğlu, N. M. & Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; Yapıları ve önemleri. *Elektronik*, *2010*(1), 20-35.
Onur, E., Tuğrul, B. & Bozyiğit, F. (2009). Repair mechanisms. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, *7*(2), 61-70.
Orak, H.H., Yağar, H. & Selen İşbilir, Ş. (2012a). Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology, 21*(2), 373-387.
Orak, H.H., Selen İşbilir, Ş. & Yağar, H. (2012b). Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology, 21*(4), 1064-1074.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. & Yönden, Z. (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, *6*(3), 331-336. https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545

Özkal, N. & Dinç, S. (1993). *Punica granatum* L. (Nar) bitkisinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, *2*(1-2), 38-50.

Özmert Ergin, S. (2019). Nar meyvesi (*Punica granatum* L.) ile farklı nar ürünlerinin antioksidan özellikleri. *Akademik Gıda*, *17*(2), 243-251. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.613590

Özyurt, D. (2005). Toplam Flavonoid Miktarının Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem ile Tayini (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü,İstanbul.

Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*(e47), 1-15. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

Parr, A. J. & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 985-1012. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<985::aid-jsfa572>3.3.co;2-z

Pawlowska, A. M., Oleszek, W. & Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(9), 3377–3380. https://doi.org/10.1021/jf703709r

Pellenz, N. L., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Duarte, T., Bolignon, A., Mastella, M. H., Teixeira, C. F., Ribeiro, E. E., Cruz, I. B. M. Da & Duarte, M. M. M. F. (2018). Analysis of in vitro cyto- and genotoxicity of barbatimão extract on human keratinocytes and fibroblasts. *BioMed Research International*, *2018* (1942451), 11. https://doi.org/10.1155/2018/1942451

Peng, S. Y., Lin, L. C., Chen, S. R., Farooqi, A. A., Cheng, Y. Bin, Tang, J. Y. & Chang, H. W. (2021). Pomegranate extract (Pomx) induces mitochondrial dysfunction and apoptosis of oral cancer cells. *Antioxidants*, *10*(7). https://doi.org/10.3390/antiox10071117

Peng, Y., Zhang, Y. & Ye, J. (2008). Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(6), 1838-1844. https://doi.org/10.1021/jf0727544

Pollio, A., Zarrelli, A., Romanucci, V., Di Mauro, A., Barra, F., Pinto, G., … Palumbo, G. (2016). Polyphenolic Profile and Targeted Bioactivity of Methanolic Extracts from Mediterranean Ethnomedicinal Plants on Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, *21*(4), 395. doi:10.3390/molecules21040395

Potter, A.J., Gollahon, K.A., Palanca, B.J.A., Harbert, M.J., Choi, Y.M., Moskovitz, A. H., Potter, J.D. & Rabinovitch, P.S. (2002). Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin, *Carcinogenesis*, *23* (3), 389-401. https://doi.org/10.1093/carcin/23.3.389

Qabaha, K., Al-Rimawi, F., Qasem, A. & Naser, S. A. (2018). Oleuropein is responsible for the major anti-ınflammatory effects of olive leaf extract. *Journal of Medicinal Food*, *21*(3), 302-305. https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0070

Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Siu, A. W. & Garcia, J. J. (2000). Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H2O2: Protection by melatonin and related molecules. *Journal of Pineal Research*, *29*(1), 54-61. https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2000.290108.x

Qiu, G.H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y. & Deng, L. (2014). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*, *67*(1), 1-12. doi:10.1007/s10616-014-9761-9

Ramezanian, A. & Erkan, M. (2018). Pomegranates (*Punica granatum* L.). Elhadi M. Yahia (Ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health içinde*. (s. 1179-1193). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd.

Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, *63*(1-3), 88-102. https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00206-8

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Riss, T. L. & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, *2*(1), 51-62.

Rizvi, S.I. & Zaid, M.A. (2005). Impairment of sodium pump and Na/H exchanger in erythrocytes from non-insulin dependent diabetes mellitus patients: effect of tea catechins. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *354*(1-2), 59-67. https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.11.008

Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866-2887. https://doi.org/10.1021/jf026182t

Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Noguera-Artiaga, L., Kačániová, M., Hernández-García, F., Cárdenas-López, J.L. & Carbonell-Barrachina, Á.A. (2017). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(3), 802-810. https://doi.org/10.1002/jsfa.7799

Ruan, J. H., Li, J., Adili, G., Sun, G. Y., Abuduaini, M., Abdulla, R., Maiwulanjiang, M., & Aisa, H. A. (2022). Phenolic Compounds and Bioactivities from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(12), 3678-3686. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08341

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, *92*(2), 147-176. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00287-4

Saad, Z., Ghadian, A.F. & Hussein, R.A. (2010). The cytotoxic activity of *Punica granatum* on growth of Hela and REF cell lines. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics, 3*(1), 7-10.

Saeed, N., Khan, M.R. & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* 12, 221. https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221

Schofield, P., Mbugua, D.M. & Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology, 91,* 21-40. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00228-0.

Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A. & Vuong, Q. (2020). Comparison of conventional extraction technique with ultrasound assisted extraction on recovery of phenolic compounds from lemon scented tea tree (*Leptospermum petersonii*) leaves. *Heliyon, 6*(4), e03666. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03666

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of*

Biochemistry, *73*, 39-85. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

Sanchez-Gonzales, G., Castro-Rumiche, C., Alvarez-Guzman, G., Flores-García, J., Barriga-Sánchez, M. (2019). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from chirimoya (*Annona cherimola* Mill) leaf. *Revista Colombiana de Quimica*, *48*(2), 21-26, http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.76029.

Sanchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F. & De Salvia, R. (2007). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *115*(3), 416-422. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.011

Savikin, K., Zdunic, G., Jankovic, T., Stanojkovic, T., Juranic, Z. & Menkovic, N. (2009). In vitrocytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*. *Natural Product Research*, *23*(18), 1731-1739. doi:10.1080/14786410802267650

Seeram, N., Adams, L., Henning, S., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(6), 360-367 doi:10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.

Selen Işbilir, Ş., Orak, H. H., Yağar, H. & Ekinci, N. (2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (Arbutus unedo L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, *11*(3), 223-237.

Serçe, A., Toptancı, B. Ç., Tanrıkut, S. E., Altaş, S., Kızıl, G., Kızıl, S. & Kızıl, M. (2016). Assessment of the antioxidant activity of silybum marianum seed extract and its protective effect against DNA oxidation, protein damage and lipid peroxidation. *Food Technology and Biotechnology*, *54*(4), 455–461. https://doi.org/10.17113/ft b.54.04.16.4323

Shiban, M. S., Al-otaibi, M. M. & Al-zoreky, N. S. (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, *2012*, 991-996.

Shinde, A., Ganu, J. & Naik, P. (2012). Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, *1*(2), 63. https://doi.org/10.4103/2277-4696.159144

Singleton, V. L. & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viniculture*, *16*(48), 144-158.

Singleton, V.L. Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.

Sitarek, P., Skala, E., Wysokinska, H., Wielanek, M., Szemraj, J., Toma, M. & Sliwinski, T. (2016). The effect of leonurus sibiricus plant extracts on stimulating repair and protective activity against oxidative DNA damage in CHO cells and content of phenolic compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 5738193. https://doi.org/10.1155/2016/5738193

Skala, E., Sitarek, P., Rozalski, M., Krajewska, U., Szemraj, J., Wysokinska, H. & Sliwinski, T. (2016). Antioxidant and DNA repair stimulating effect of extracts from transformed and normal roots of rhaponticum carthamoides against induced oxidative stress and DNA damage in CHO cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 5753139. https://doi.org/10.1155/2016/5753139

Sofowora, A., Ogunbodede, E. & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary, and*

Alternative Medicines, 10(5), 210-229. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2
Somova, L. I., Shode, F. O. & Mipando, M. (2004). Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine, 11*(2-3), 121-129. https://doi.org/10.1078/0944-7113-00329
Stanic, S., Matic, S., Solujic, S. & Milosevic, T. (2009). Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygria* and gallic acid on *Drosophila Melanogaster*. *Archives of Biological Sciences, 61*(2), 261-266. https://doi.org/10.2298/ABS0901261S
Steenken, S. & Jovanovic, S.V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society, 119*, 617-618.
Sukhikh, S., Noskova, S., Pungin, A., Ivanova, S., Skrypnik, L., Chupakhin, E. & Babich, O. (2021). Study of the biologically active properties of medicinal plant *Cotinus coggygria*. *Plants, 10*, 1224.
Syama, H.P., Arya, A.D., Dhanya, R., Nisha, P., Sundaresan, A., Jacob, E. & Jayamurthy, P. (2017). Quantification of phenolics in *Syzygium cumini* seed and their modulatory role on tertiary butyl-hydrogen peroxide-induced oxidative stress in H9c2 cell lines and key enzymes in cardioprotection. *Journal of food science and technology, 54*(7), 2115-2125.
Şahin, S., Aybastıer, Ö., Dawbaa, S., Karkar, B. & Çakmak, T. (2020). Study of the Ability of lutein and neoxanthin as standards and in the extract of *Chlamydomonas reinhardtii* to prevent oxidatively induced DNA base damage using ultrasensitive GC-MS/MS analysis. *Chromatographia, 83*(8), 919-926. https://doi.org/10.1007/s10337-020-03918-8
Şimşek, M. & İkinci, A. (2017). Narın (*Punica granatum* L.) insan sağlığına etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21*, 494-506. https://doi.org/10.29050/harranziraat.326923
Taamalli, A., Contreras, M. D. M., Abu-Reidah, I. M., Trabelsi, N. & Youssef, B.N. (2019). Quality of phenolic compounds: Occurrence, health benefits, and applications in food industry. *Journal of Food Quality*, *2019*,1-2 https://doi.org/10.1155/2019/9594646
Tahmas Kahyaoğlu, D. (2021). Sarımsak dişinin antioksidan aktivitesinin sarımsak kabuğu ve sapı ile karşılaştırılması: Sarımsak tarımsal atıklarının kullanım potansiyelinin belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 8*(2), 463-469. 10.30910/turkjans.884541.
Talmaciu, A.I., Volf, I. & Popa, V.I. (2015). A comparative analysis of the "Green" techniques applied for polyphenols extraction from bioresources. *Chemistry and Biodiversity*, *12*(11), 1635-1651. https://doi.org/10.1002/cbdv.201400415
Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B. & Vazifeshenas, M.R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae, 126*(2), 180-185. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.001
Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M. & Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, *34*(3), 1523-1527. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.007
Temiz, M.A. (2016). Zeytin Yaprağı (*Olea Europaea* L.) Ekstraktı'nın Deneysel Diyabette Antidiyabetik, Antioksidan, 8-OHdG ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması (Doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü. & Demirel, G. Y. (2013). Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, *1*(3), 74-89. https://doi.org/10.5606/tji.2013.267

Tokur, O. & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *6*(1), 112-118. https://doi.org/10.31196/huvfd.325794

Topalovic, D., Dekanski, D., Spremo-Potparevic, B., Pirkovic, A., Borozan, S., Bajic, V., Stojanovic, D., Giampieri, F., Gasparrini, M. & Zivkovic, L. (2018). Dry olive leaf extract attenuates DNA damage induced by estradiol and diethylstilbestrol in human peripheral blood cells in vitro, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *845*, 402993. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.001

Toptancı, B. Ç. (2018). Oxidative DNA damage protective ability of *Punica granatum*. *Journal of the Institute of Science and Technology*, *8*(3), 177-181.

Tranfic Bakic, M., Pedisic, S., Zoric, Z., Dragovic-Uzelac, V. & Nincevic Grassino, A. (2019). Effect of microwave-assisted extraction on polyphenols recovery from tomato peel waste. *Acta Chimica Slovenica*, *66*(2), 367-377. doi:https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4866

Tunç, K., Konca, T. & Hoş, A. (2013). *Punica granatum* Linn. (nar) bitkisinin antibakteriyel etkisinin araştırılması. *SAU Journal of Science and Technology, 17*(2), 167-172.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry, 266*(1-2), 37-56. https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*(1), 44-84. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001

Vermerris, W. & Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer.

Vieito, C., Fernandes, É., Velho, M. V. & Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (*Pinus pinaster* subsp. Atlantica). *Chemical Engineering Transactions*, *64*, 127-132. https://doi.org/10.3303/CET1864022

Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L. & Brooks, G. A. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *Journal of Applied Physiology*, *75*(2), 566-572. https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.2.566

Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D. & Morelo Dal Bosco, S. (2014). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(3), 1427-1433. https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400

Wagner, J.R., Lier, J.E., Berger, M. & Cadet, J. (1994). Thymidine hydroxyperoxides: Structural assignment, conformational features and thermal decomposition in water. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(6), 2235-2242.

Wang, A. Y., Zhou, M. Y. & Lin, W. C. (2011). Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. *Food Chemistry*, *124*(3), 958-963. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.035

Wang, G., Wang, J., Du, L. & Li, F. (2015). Effect and mechanism of total flavonoids extracted from *Cotinus coggygria* against glioblastoma cancer in vitro and in vivo. *BioMed Research International*, Article ID:856349. https://doi.org/10.1155/2015/856349

Wang, X., Liu, J., Xie, Z., Rao, J., Xu, G., Huang, K., Li, W. & Yin, Z. (2019). Chlorogenic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in A498 human kidney cancer cells via inactivating PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71*(7), 1100-1109. https://doi.org/10.1111/jphp.13095

Wei, X., Li, S., Li, T., Liu, L., Liu, Y., Wang, H., Zhou, Y., Liang, F., Yu , X., Zang , W., Zhao, M. & Zhao, Z. (2019). Pomegranate peel extract ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats through suppressing p38MAPK/Nrf2 pathway. *Journal of Functional Foods, 65*. 103712. doi:10.1016/j.jff.2019.103712

Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H. S., Van Breemen, R. B., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D. (2000). Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*. *Journal of Natural Products, 63*(12), 1696-1698.

Winnik, W. M. & Kitchin, K. T. (2008). Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS). *Toxicology and Applied Pharmacology, 233*(1), 100-106. https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.003

Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51* (3), 609.

Yan, L., Zhou, X., Shi, L., Shalimu, D., Ma, C. & Liu, Y. (2017). Phenolic profiles and antioxidant activities of six chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *International Journal of Food Properties, 20*(sup 1), S94-S107

Yen, G. C. & Wu, J. Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. *Food Chemistry, 65*(3), 375-379. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00239-8

Yerer, M. B. & Aydoğan, S. (2000). Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 9*(1), 49-53.

Yıldız, G. & Uylaşer, V. (2011). Doğal bir antimikrobiyel: Oleuropein. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University, 25*(1), 131-142.

Yokuş, B. & Çakır, U. (2002). Invivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkerı; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 22*, 535-543.

You, B.-J., Hour, M.-J., Chen, L.-Y., Luo, S.-C., Hsu, P.-H. & Lee, H.-Z. (2019). Fenofibrate induces human hepatoma Hep3B cells apoptosis and necroptosis through inhibition of thioesterase domain of fatty acid synthase. *Scientific Reports, 9*(1), doi:10.1038/s41598-019-39778-y

Yu, Y., Cui, Y., Niedernhofer, L. J. & Wang, Y. (2016). Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. *Chemical Research in Toxicology, 29*(12), 2008-2039.

Yüksek, Ş. (2011). *Nigella sativa* Sulu Ekstretesinin Oksidatif DNA Hasarına Etkileri (Yüksek Lisans Tezi). Afyon Kocatepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Zargar, M. & Pourahmad, J. (2014). Protective effect of *Punica granatum* L. (Pomegranate) fruit extracts and ellagic acid against cytotoxicity induced by methyl tertiary butyl ether in isolated rat hepatocytes. *Toxicological and Environmental Chemistry, 96*(1), 150-161. https://doi.org/10.1080/02772248.2014.918461

Zastawny, T.H., Altman, S.A., Randers-Eichhom, L., Madurawe, R., Lumpkin, J.A., Dizdaroğlu, M. & Rao, G. (1995). DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with irons ions. *Free Radical Biology and Medicine, 18*(6), 1013-1022. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00241-b

Zerbinati, N., Lotti, T., Monticelli, D., Rauso, R., González-Isaza, P., D'este, E., Calligaro, A., Sommatis, S., Maccario, C., Mocchi, R., Lotti, J., Wollina, U., Tchernev, G. & França, K. (2018). In vitro evaluation of the biosafety of hyaluronic acid PEG cross-linked with micromolecules of calcium hydroxyapatite in low concentration. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 6*(1), 15-19. https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.044

Zhang, L., Yang, X., Zhang, Y., Wang, L. & Zhang, R. (2011). In vitro antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(3), 234-240. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.007

Zhao, J., Wang, S., Zhong, W., Yang, B., Sun, L. & Zheng, Y. (2016). Oxidative stress in the trabecular meshwork (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *38*(4), 995-1002. doi:10.3892/ijmm.2016.2714

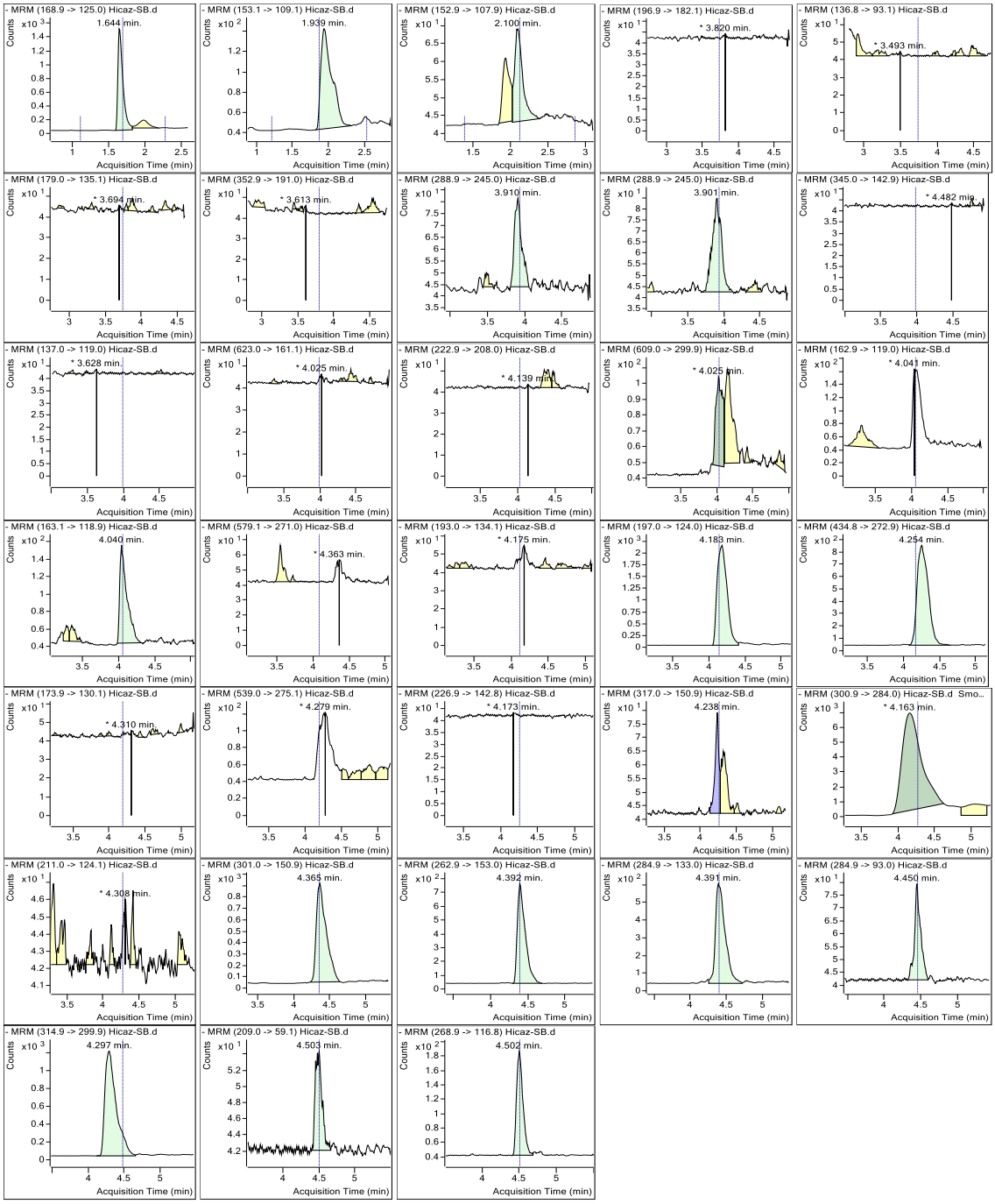
Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry 64*(4), 555-559. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2

Zoric, N., Kopjar, N., Rodriguez, J. V., Tomic, S. & Kosalec, I. (2021). Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Acta Pharmaceutica*, *71*(1), 131-141. https://doi.org/10.2478/acph-2021-0003

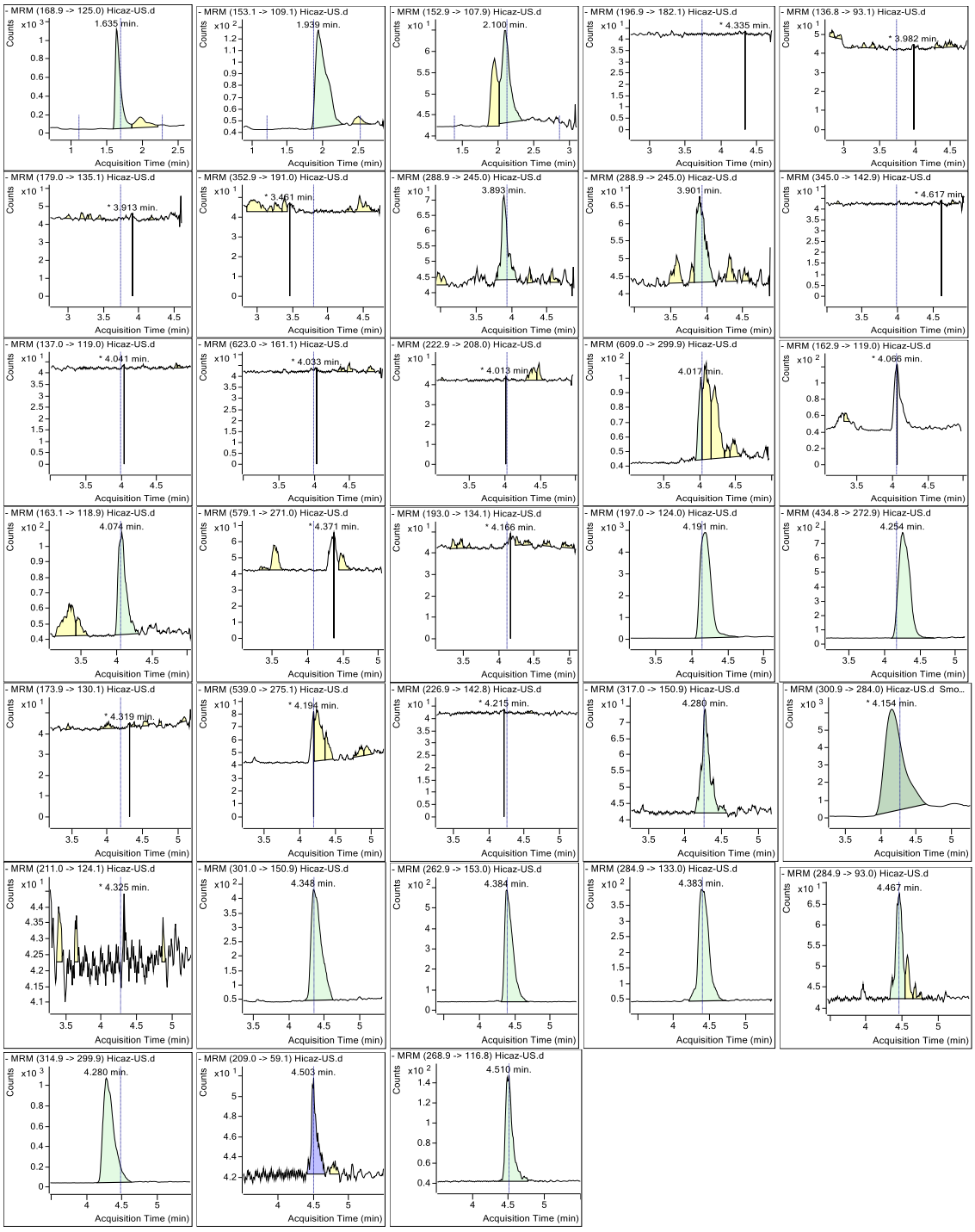
Zucco, F., De Angelis, I. & Stammati, A. (1998). Cellular models for ın vitro toxicity testing. Martin Clynes (Ed.), *Animal Cell Culture Techniques içinde* (s. 395-422). Berlin: Springer.

EK-1

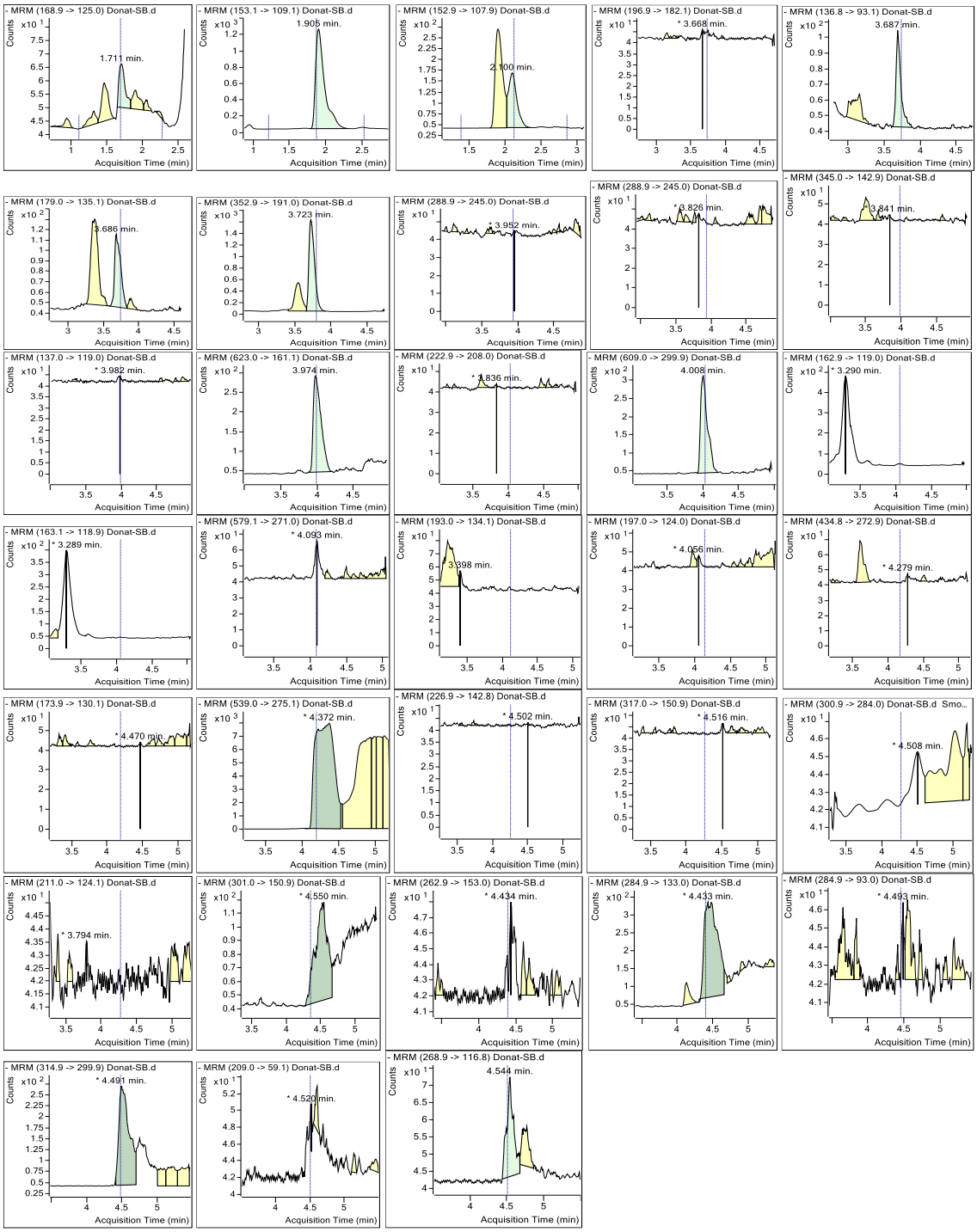
LC-MS/MS Yöntemi ile Tespit Edilen Fenolik Bileşiklerin Kromatogramları



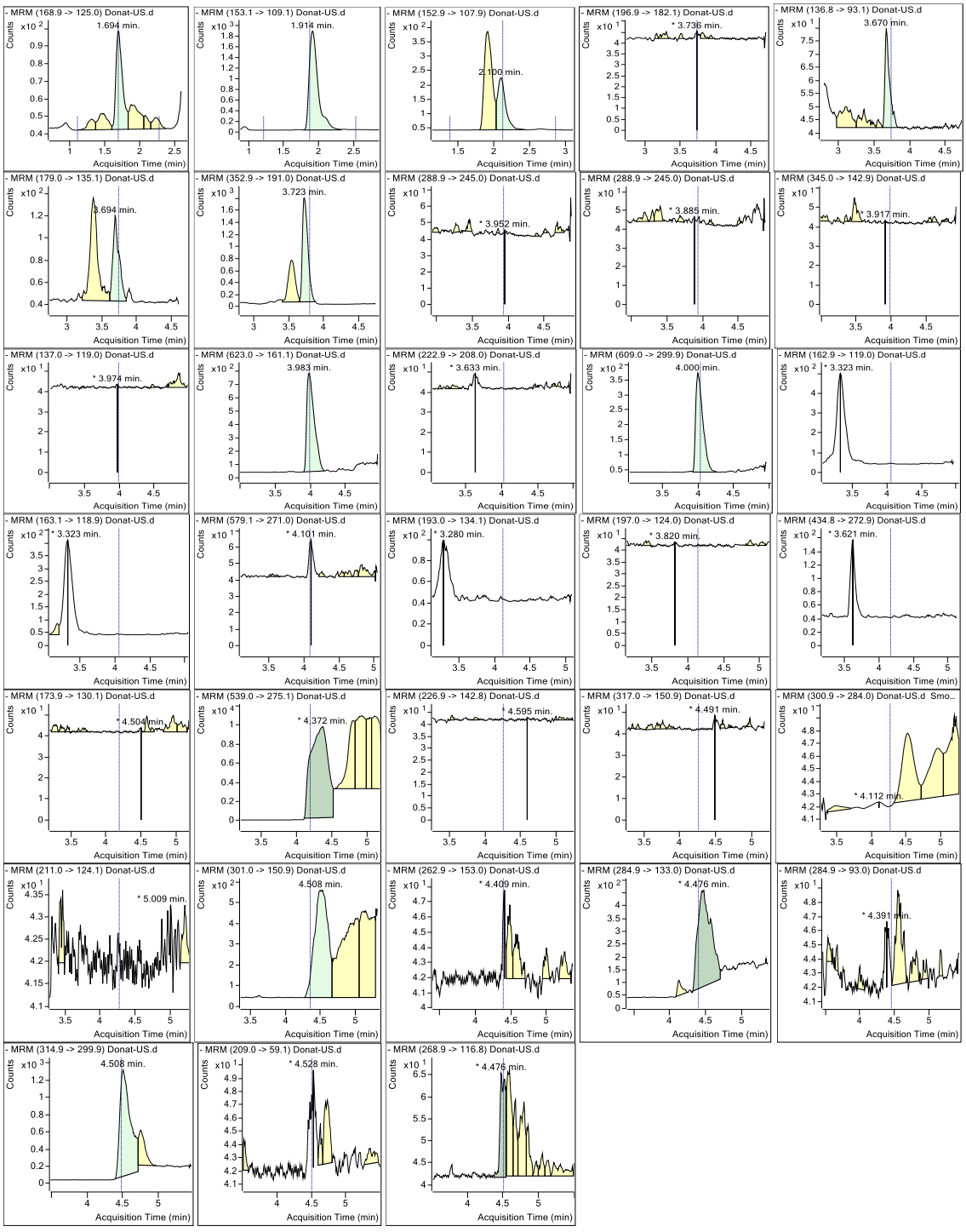
EK 1.1. Nar-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları



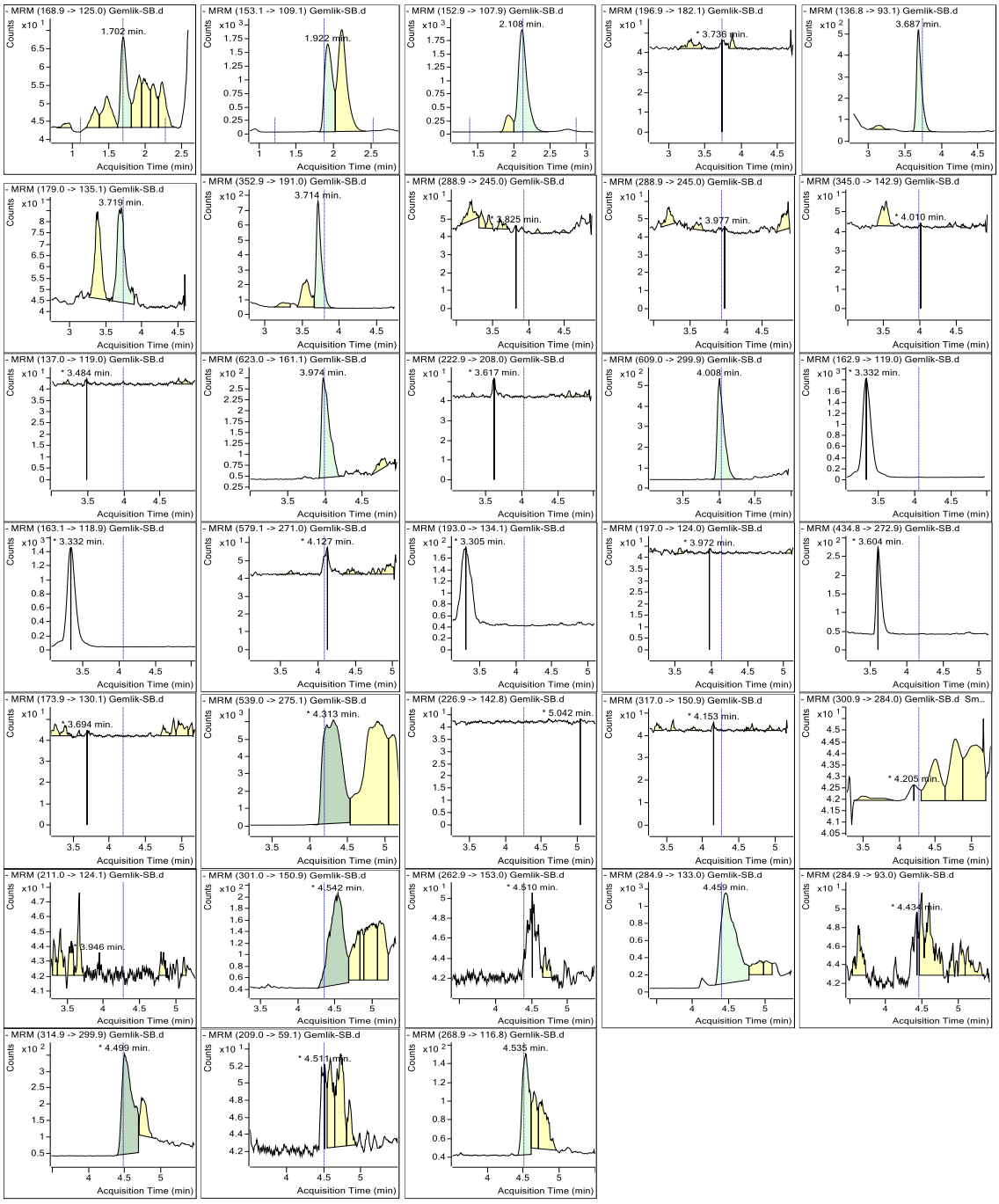
EK 1.2. Nar-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları



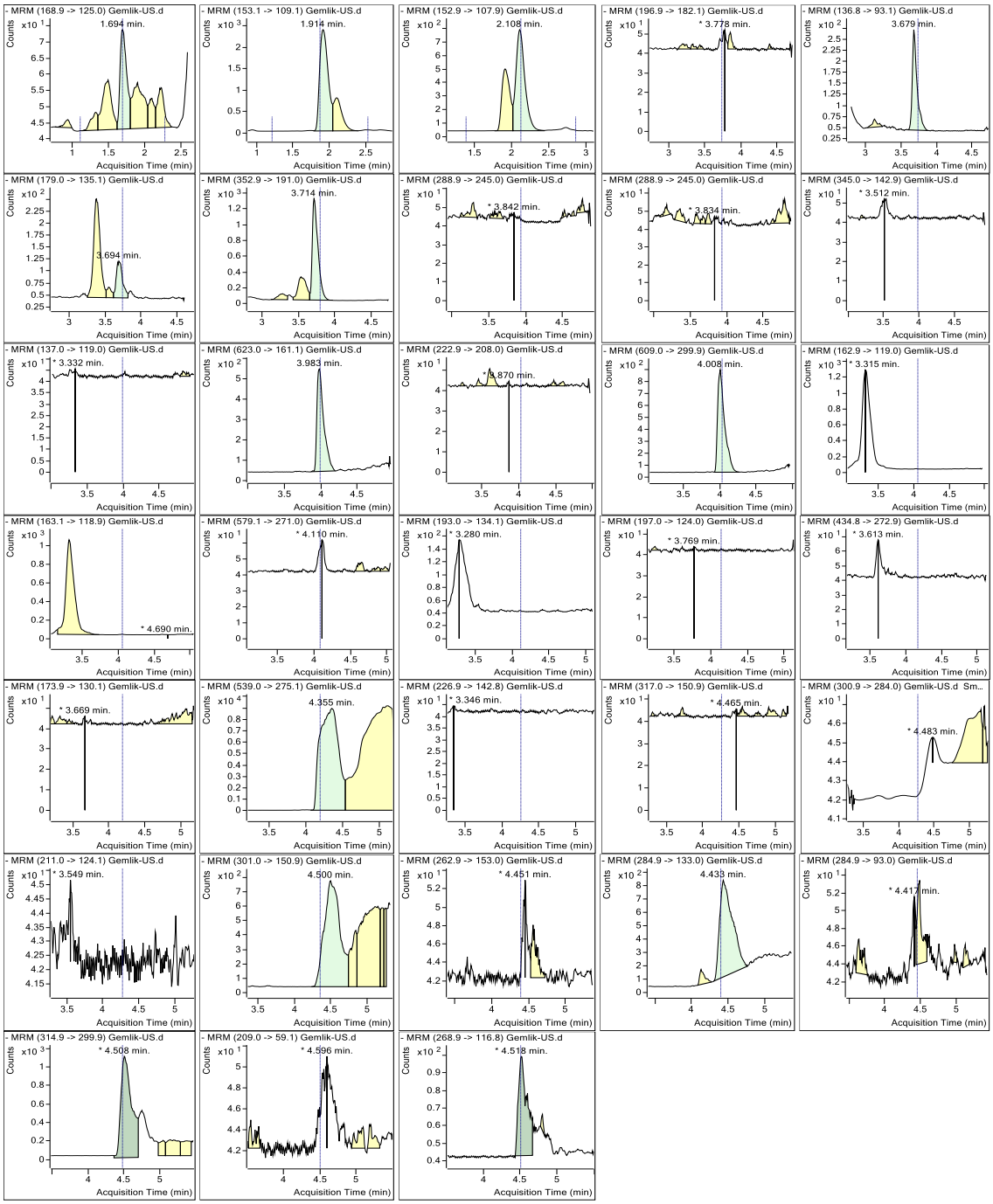
EK 1.3. Domat-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları



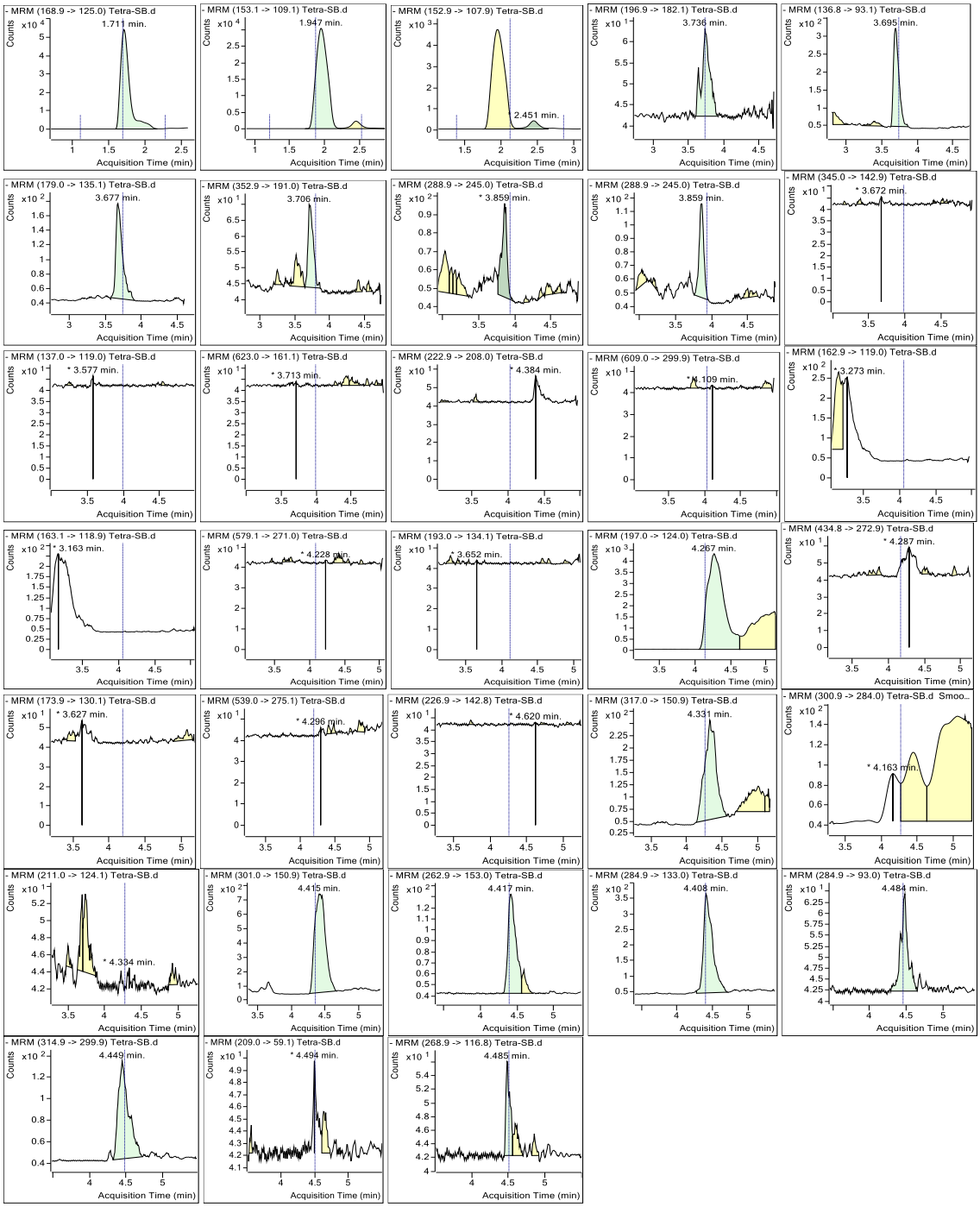
EK 1.4. Domat-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları



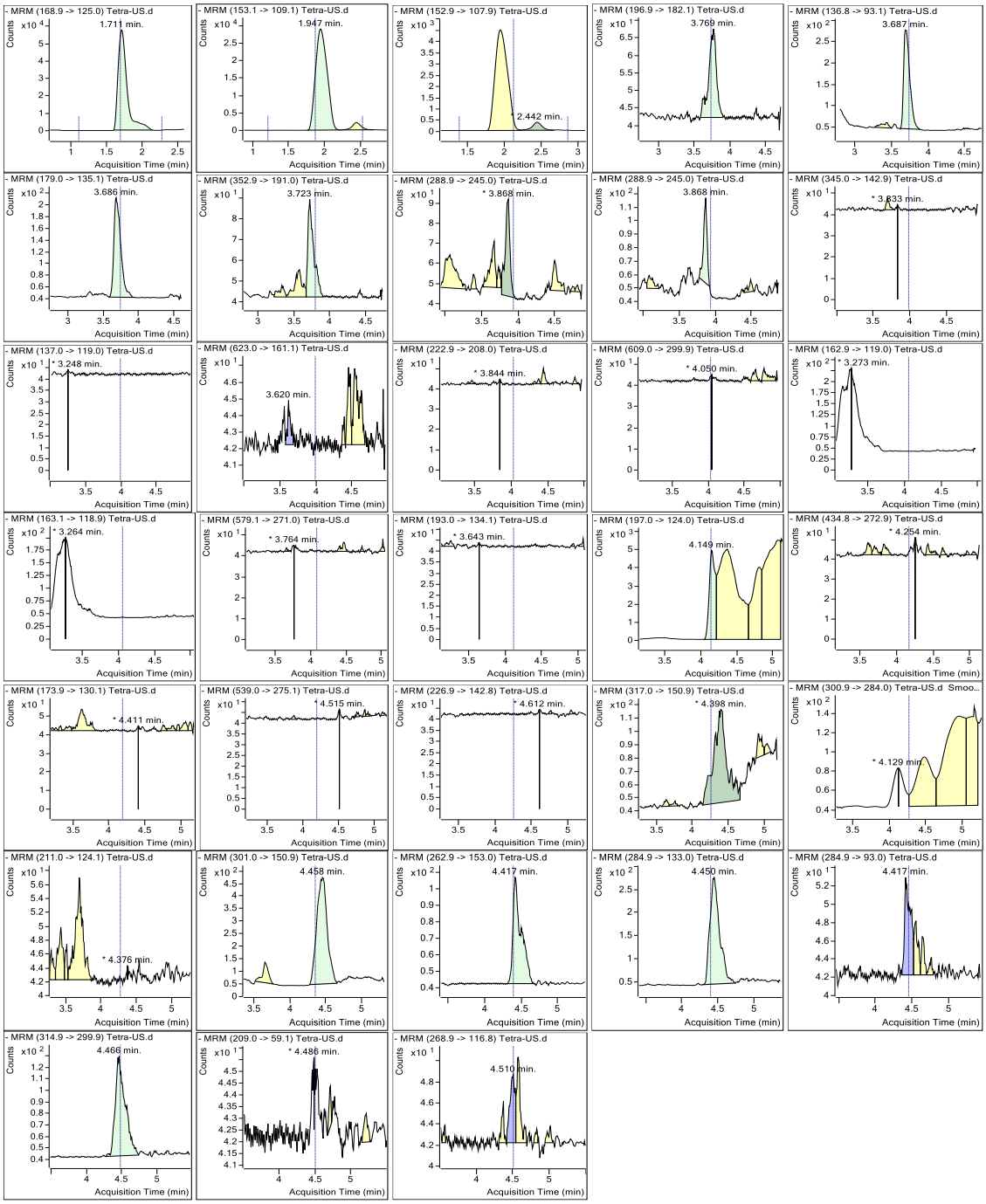
EK 1.5. Gemlik-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları



EK 1.6. Gemlik-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları



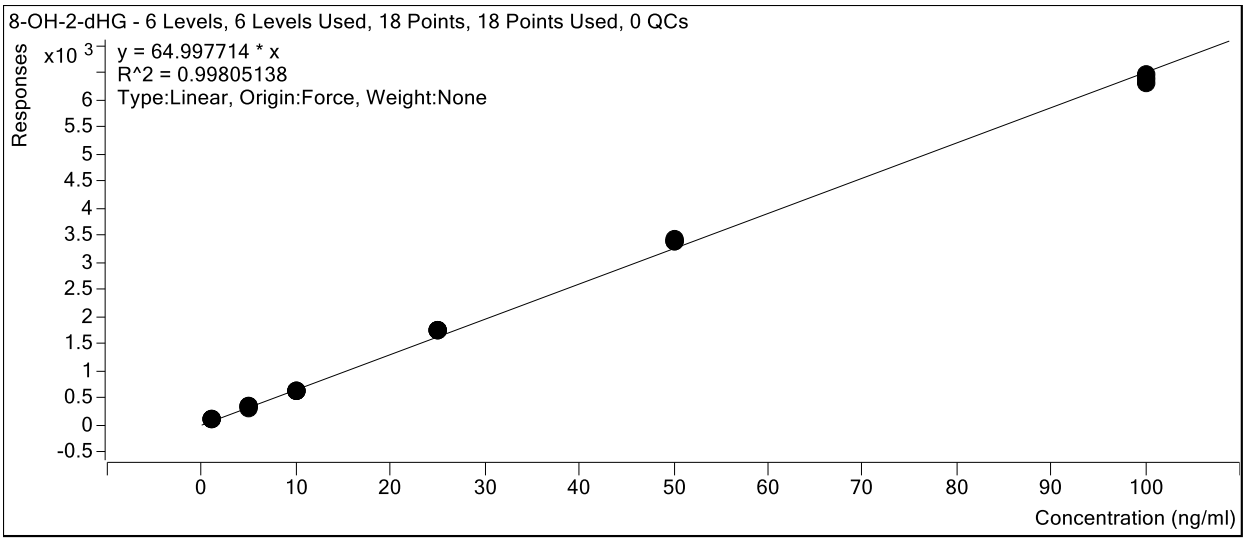
EK 1.7. Tetra-SBE'nin LC-MS/MS kromatogramları



EK 1.8. Tetra-USE'nin LC-MS/MS kromatogramları

EK-2

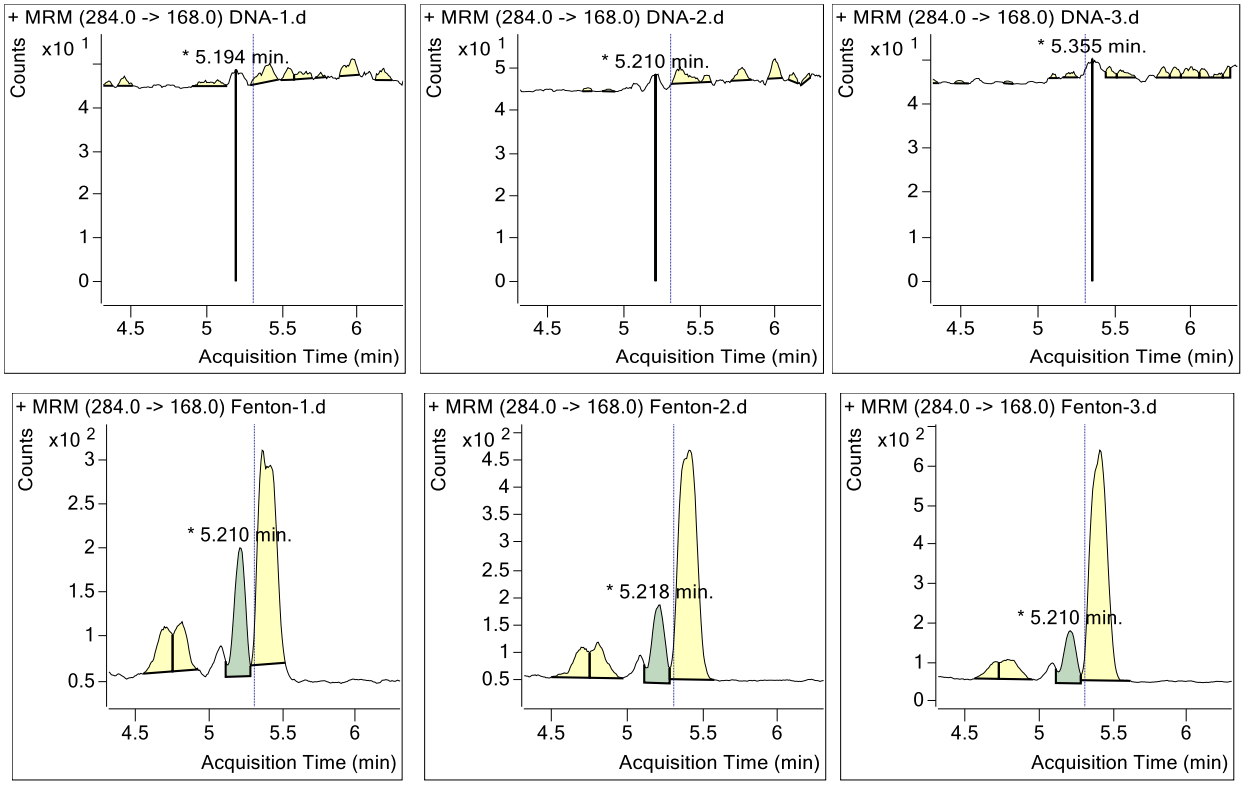
LC-MS/MS ile 8-OH-2-dHG kalibrasyon grafiği



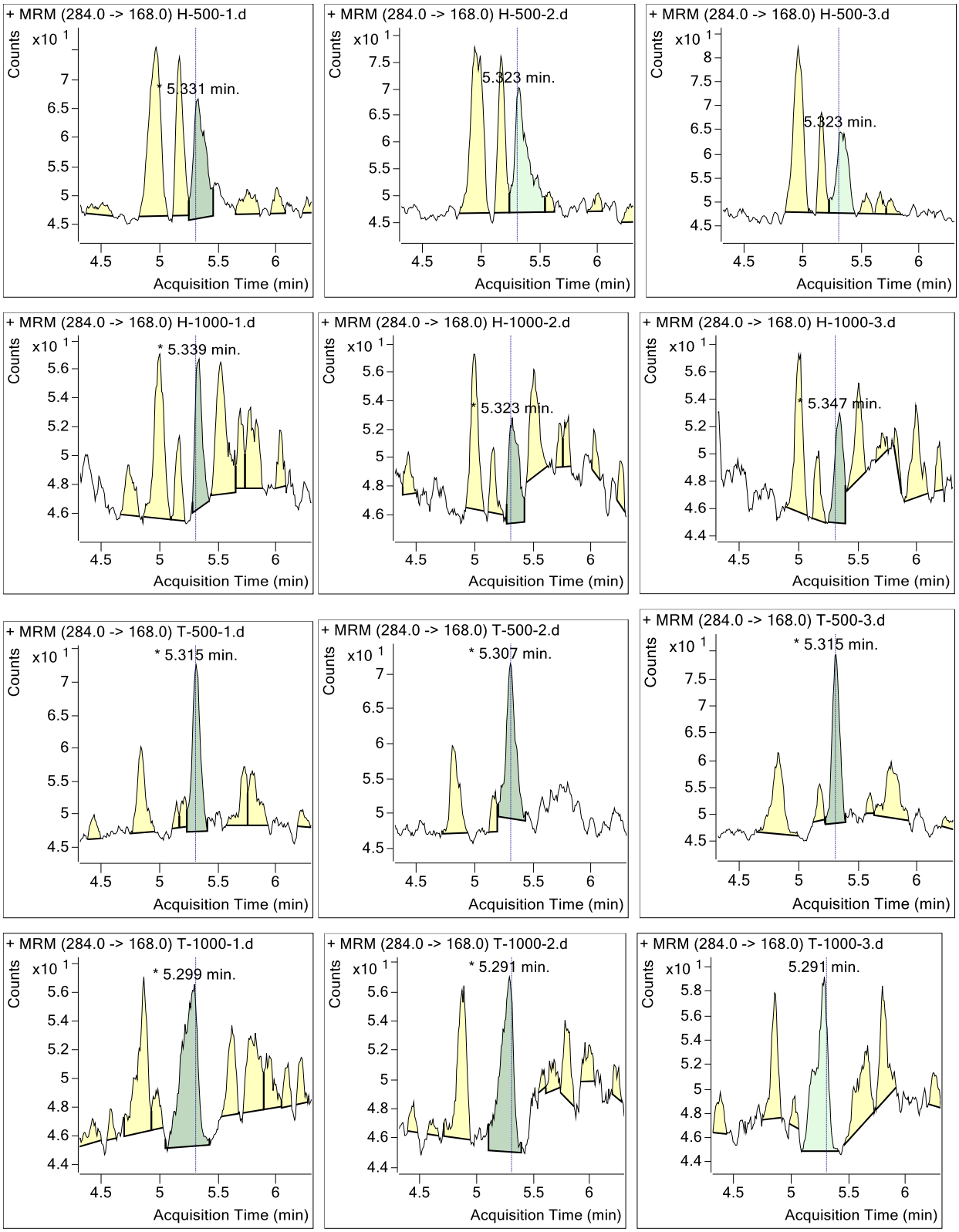
EK 2.1. 8-OH-2'-dHG kalibrasyon grafiği

EK-3

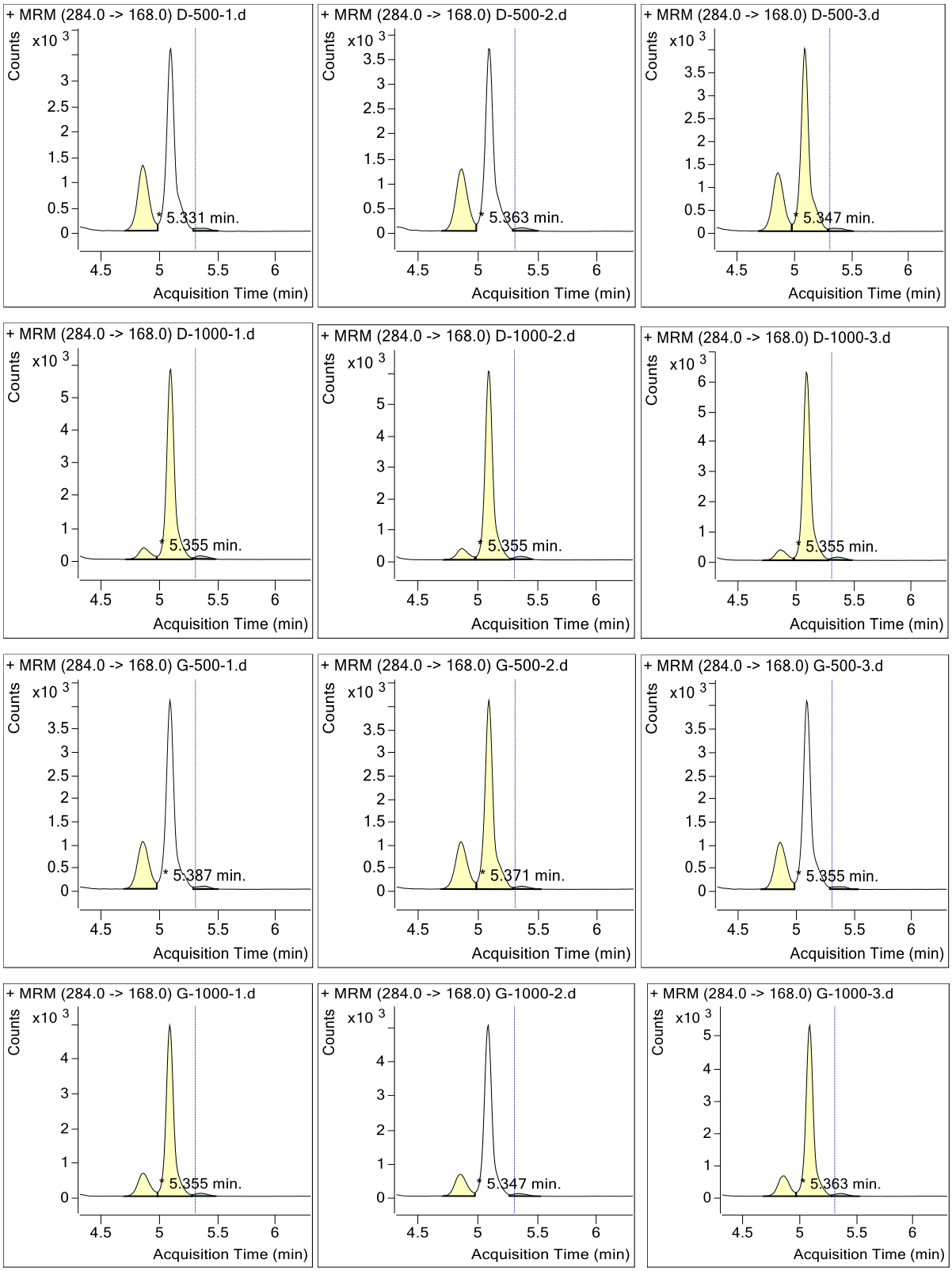
LC-MS/MS Yöntemi ile Buzağı Timus DNA'sında Oksidatif Hasar Ürünlerinin Ölçülerek Ekstraktların Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi



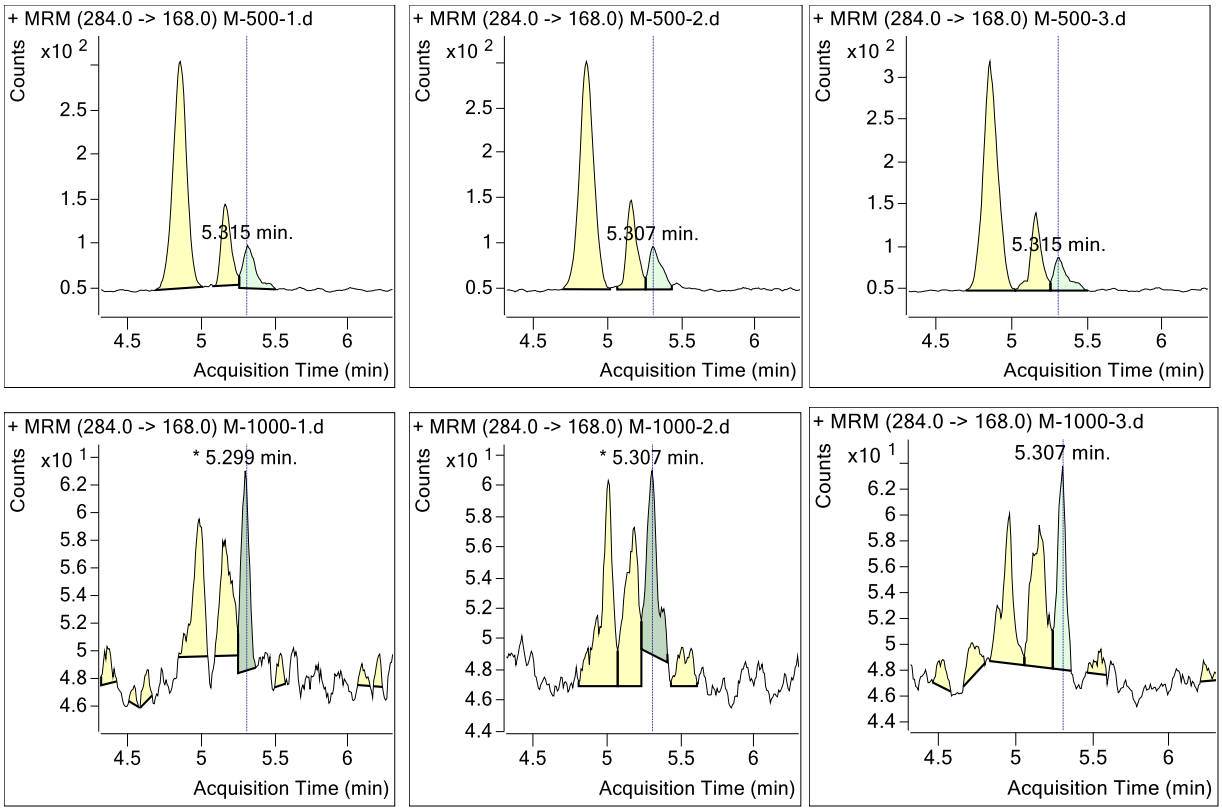
EK 3.1. Buzağı timus DNA'sında Fenton reaksiyonu öncesinde ve sonrasında hasar ürünü ölçümü



EK 3.2. Hicaz-USE ve Tetra-USE'nin DNA hasarı üzerine olan etkisi



EK 3.3. Domat-USE ve Gemlik-USE'nin DNA hasarı üzerine olan etkisi



EK 3.4. Mix ekstraktının (Tetra yaprağı+Nar kabuğu+Domat zeytin yaprağı ekstrakt karışımı) DNA hasarı üzerine olan etkisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dua DANJOLLİ-HASHANİ

Doğum Yeri : Prizren/ Kosova

Ana Dili: Arnavutça

Yabancı Dili: Türkçe, İngilizce

Lise: Luciano Motroni, Eczacılık Teknisyeni, 2009 yılı mezunu

Lisans: 1) Prishtina Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 2013 yılı mezunu
2) Tetova Üniversitesi, Fen Fakültesi, Analitik Biyokimya Bölümü, 2021 yılı mezunu

Yüksek Lisans: Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2015 yılı mezunu

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Heimerer Koleji, 2017-2022

Yayınları:

Danjolli, D. & Akşit, H. (2016). Effects of N Acetylcysteine on Expression and Localization of Some Lectins in The Liver of Experimental Hepatic Intoxication. *Van Veterinary Journal, 27*(1), 11–16.

Danjolli-Hashani, D., Fejza, A., Ibrahimi, B. & Agahi, R. (2021). Comparing dipstick tests with other urinalysis methods in Kosovo. *Biochimica Clinica, 45*(4), 375-380.

Danjolli-Hashani, D. & Selen-Işbilir, Ş. (2022). Effects of Extraction Period on Bioactive Compounds Extracted from *Olea Europaea* (var. Domat) Leaves by Ultrasound-Assisted Extraction. *Acta Chimica Slovenica, 69*(2), 430-436.

Danjolli-Hashani, D. & Reka, A.A. (2022). Job Satisfaction during Covid-19 period amongst Higher Educational and Medical Workers in Kosovo. *Journal of Educational Research, 4*(7-8), 32-44.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ ile İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Danjolli-Hashani, D. & Selen-Işbilir, Ş. (2022). Effects of Extraction Period on Bioactive Compounds Extracted from Olea Europaea (var. Domat) Leaves by Ultrasound-Assisted Extraction. *Acta Chimica Slovenica, 69*(2), 430-436.

Danjolli-Hashani, D. & Selen-İşbilir, Ş. Cytotoxic effect of *Purina granatum* L. extract on Hep3B (liver) cancer cell line. 8th International Conference on Engineering and Natural Science (ICENS 2022, Hybrid Event), May 18-22 2022, Istanbul. (Sözel Bildiri)