T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARA DUT (*Morus nigra*) YAPRAĞI ETANOL EKSTRAKTININ DNA GLİKASYONUNA ETKİSİ

Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran 2018

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL tarafından yapılan "Karadut (*Morus nigra*) Yaprağı Etanol Ekstraktinin DNA Glikasyonuna Etkisi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	
Başkan:	Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN	
Üye	: Prof. Dr. Göksel KIZIL (Danışman)	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Nevin ARSLAN	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 05/06/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Doç. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca; engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, birlikte çalışma şansımızı elimizden almaya çalışsalar da her zaman yanımda olduğu ve desteğini esirgemediği için bana hem öğretmen hem de baba olduğu için; çok sevgili hocam, danışmanım; Prof. Dr .Murat KIZIL' a teşekkür ederim.

Çok sevgili hocam, danışmanım; Prof. Dr. Göksel KIZIL'a zor günler geçirmesine rağmen pozitifliği ve tecrübesi ile profesyonelliği elden bırakmadığı ve beni annem gibi sevdiği için teşekkür ederim

Pratik zekası, neşesi, tecrübesi ile bu çalışmayı yapmama büyük katkı sağladığı için ve her yeni günde yeni bir şey öğrettiği için hocam ve ablam; Dr. Bircan ÇEKEN TOPTANCI' ya teşekkür ederim.

Tez savunma jürilerim; Prof. Dr. Çetin AYTEKİN ve Dr. Öğr. Üyesi Nevin ARSLAN'a teşekkür ederim.

Sevgili annem Behiye AKAY'a güçlü bir kadın olmayı öğrettiği için, her şartta benim ve kardeşlerimin yanında olduğu için, bizi çok sevdiği ve başımız sıkışınca koşacak ilk kucak olduğu için teşekkür ederim.

Sevgili amcam, Doç. Dr. Ali Ferruh AKAY'a her şartta benim ve ailemin yanında olduğu için, gerçek baba yarısı olduğu için teşekkür ederim.

En değerlilerim kardeşlerim Neval AKAY, Murat AKAY ve evimizin neşesi Berdil AKAY'a mutluluk kaynaklarım oldukları için teşekkür ederim.

Sevgili eşim Veysel BÜLBÜL'e hastalıkta sağlıkta iyi günde kötü günde yanımda olduğu için her şartta desteğini esirgemediği için teşekkür ederim.

Sevgili biyoorganik araştırma grubu arkadaşlarım Nesrin İNCEÖREN ve Esra YILMAZ'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Dr. Mehmet Hayrullah AKYILDIZ'a, Hayrettin DİNÇ'e ve Pelin ALTUN'a kötü günlerimde desteklerini esirgemedikleri ve gerçek dost oldukları için teşekkür ederim.

Sevgili oğlum Azot'a tez yazım süresinde yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
TEŞEKKÜR……..		I
İÇİNDEKİLER……..		II
ÖZET……..…		V
ABSTRACT……...		VI
ÇİZELGE LİSTESİ……..		VII
ŞEKİL LİSTESİ.....		VIII
KISALTMALAR VE SİMGELER…….		X
1.	**GİRİŞ**……..…….	1
1.1.	Glikasyon……..……	1
1.2.	Amadori Ürünleri…….……..……...	2
1.3.	Dikarbonil Ürünleri……...…….……...	2
1.4.	İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycation End Products, AGE)…….	3
1.5.	AGE'lerin Hastalık Ve Yaşlanmadaki Rolü…….	5
1.5.1.	Diyabetus Mellitus…...…….....	5
1.5.2.	Böbrek Rahatsızlıkları……..	7
1.5.3.	Göz, Cilt Rahatsızlıkları ve Yaşlanma…….....	7
1.5.4.	AGE'lerin Deri Ve Yaradaki Etkisi……..	7
1.6.	Glikotoksinler……...…….	8
1.7.	ROT (Reaktif Oksijen Türleri) …….…….…….....	9
1.8.	Glutatyon……...……	10
1.9.	RAGE (AGE Bağlayıcı Reseptör) ……...	11
1.10.	DNA' nın Glikasyonu……...	12
1.11.	AGE İnhibitörlerinin Antiglikasyon Mekanizmaları...…….	15
1.11.1.	Doğal Ürünlerden AGE İnhibitörleri……..……..	15
1.10.2.	Sentetik AGE İnhibitörleri……..……..	15
1.12.	Neden Fruktoz…….……..	20
1.13.	Antioksidantlar……..…….....	20
1.14.	Çalışmanın Amacı, Önemi Ve Hedefleri……..	21
1.14.1.	Çalışmanın Amacı…….	21
1.14.2.	Çalışmanın Önemi…….	22

1.14.3. Çalışmanın Hedefleri…… 22
2. KAYNAK ÖZETLERİ……...……..... 23
3. MATERYAL VE METOT……. 27
3.1. Materyal……...……. 27
3.1.1. Kara Dut (*Morus nigra*) Yaprağı…….. 27
3.1.2. Kullanılan Aletler……. 27
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler……. 27
3.2. Metot…… 28
3.2.1. Kara Dut Yapraklarının Etanol Ekstraktının Hazırlanması…….. 28
3.2.1.1 Maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon…….…….. 29
3.2.1.2 Sokslet yöntemi ile ekstraksiyon……..……..... 30
3.2.1.3 Ultrasound yöntemi ile ekstraksiyon…….……..... 31
3.2.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayin……..……..... 32
3.2.3. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini……. 33
3.2.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi…...…….. 33
3.2.5. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi……. 33
3.2.7. *İn vitro* DNA'nın glikasyonu: (DNA'nın fruktozilasyonu) ……. 34
3.2.8. Diyaliz İle DNA' ya Bağlanmamış Şekerleri Uzaklaştırmak……... 34
3.2.9. Fruktozamin Testi (DNA' da Amadori ürünlerinin Tayini) ……..…. 35
3.2.10. UV-Visible Absorbans Spektroskopisi (200-400 nm) …… 35
3.2.11. Floresans Spektroskopisi (360-500nm) ……... 35
3.2.12. DNA Oksidasyonu……...……...…….. 35
3.2.13. Agaroz Jel Elektroforezi……...…… 36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI……. 37
4.1. Kara Dut Yaprak Ekstrelerinin Yüzde Verimi…….…..…….. 37
4.2. Total Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktar Tayini Söndürme……. 38
4.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi ……...……. 39
4.4. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi……...……...….... 40
4.5 Floresans Spektroskopisi (360-500 nm)…… 41
4.6. UV-Visible Absorbans Spektroskopisi (200-400 nm ……. 42
4.7**.** Fruktozamin Testi (DNA' da Amadori ürünlerinin Tayini))…..…….. 44
4.8. Agaroz Jel Elektroforezi……... 45
5 TARTIŞMA VE SONUÇ…….…….. 49

5.1	Antioksidant Çalışmalar……	50
5.1.1.	Total Fenolik ve Flavonoid Miktarları……..	50
5.1.2.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesİ……	52
5.1.3.	Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi……	53
5.2.	Agaroz Jel Elektroforezi ……..	54
5.2.1.	OH Radikali Kaynaklı DNA Hasarı Kara Dut Yapraklarının ve Etken Maddesi Kuersetinin Etkis……..	55
5.2.2.	Fruktoz Kaynaklı DNA Hasarı Üzerine Kara Dut Yapraklarının ve Etken Maddesi Kuersetinin Etkisi……...……...…….	55
5.3.	Total AGE Floresans Yoğunluğu…….……..……...	56
5.4.	UV Spektroskopi Çalışması……..	57
5.5.	NBT İndirgenmesi (Fruktoz Amin Testi)……...……..	59
6.	**KAYNAKLAR**……...……...……...……...	61
	ÖZGEÇMİŞ……...……...……	65

ÖZET

KARA DUT (*Morus Nigra*) YAPRAĞI ETANOL EKSTRAKTININ
DNA GLİKASYONUNA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2018

Son 30 yılda hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde şeker katkılı gıdaların ve şekerli içeceklerin tüketiminin artması ile metabolik hastalıklarda hızlı bir artış meydana gelmiştir. Özellikle fruktozun tatlandırıcı olarak yaygın şekilde kullanılmasının lipogenezis ve hücre içi lipit birikimini arttırdığı bilinmektedir. Modern beslenme ile ilişkili metabolik hastalıkların patogenezinde ortaya çıkan bir konu İleri Glikasyon Son Ürünlerin (AGE) rolüdür. AGE'leri sadece metabolik kontrolü değil aynı zamanda küresel sağlığı da etkilemektedir. DNA'nın şekerle reaksiyona girmesi DNA-AGE oluşumu ile sonuçlanır. Glikasyon DNA' ya önemli derecede hasar verir. DNA'nın depürinasyonu iplikçik kopması, ekleme, slime gibi mutasyonlara neden olur. Bu nedenle DNA-AGE'leri; yaşlanma sırasında oluşan genomic bütünlüğün kaybedilmesi, kanser, nörolojik hastalıklar ve kalp dammar hastalıkları gibi birçok hastalığın en önemli nedenlerinden biridir. İleri glikasyon sürecinin Diyabetus mellitusta komplikasyonlarının gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, Kara dut (*Morus nigra*) yaprağının; sokslet, maserasyon, ultrasound yöntemleri ile hazırlanan etanol ekstraktlarının total fenolik, total flavonoid, ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Sokslet yöntemi ile elde edilen ekstrakt test edilen tüm parametlerde en iyi aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Bu yöntemle elde edilen ekstraktın aynı zamanda hidroksi radikalini söndürme aktivitesine bakıldı. Ayrıca Kara dut yapraklarının etanol ekstraktının ve yaprağın etken maddelerinden biri olan kuarsetinin fruktoz kaynaklı DNA glikasyonunu ve hidroksi radikali kaynaklı oksidatif DNA hasarını inhibisyon etkilerinin belirlemesi amaçladı. Çalışmada, fruktoz (50mM) ile plasmid DNA (25µg/ml) % gün boyunca steril koşullarda 37^{o}C' de inkübe edildi. Dut yaprağının etanol ekstraktı (50-250 µg/ml) ve kuersetin (50-250 µg/ml)'nin antiglikasyon aktiviteleri incelendi. Reaksiyon ürünü, floresans ve UV spektroskopisi, nitroblue tetrazolium (NBT) indirgeme analizi ve elektroforetik çalışma ile karakterize edildi.

Sonuç olarak; *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktlarının 1mg'ının içerdiği fenolik bileşenleri; sokslet yönteminde 76,3±0.003µg Gallik asit (GAE), maserasyon yönteminde 64,4±0.003 µg Gallik asit (GAE), ultrasound yönteminde 54,8±0.003 µg Gallik asit (GAE) eşdeğer olarak belirlendi. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının 1 mg'ının içerdiği flavonoid miktarı ise; sokslet yönteminde 143.94±0.06 µg Kuersetin (QUE), maserasyon yönteminde 138,62±0.06 µg Kuersetin (QUE), ultrasound yönteminde 105,33±0.06 µg Kuersetin (QUE) eşdeğer olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: DNA Glikasyonu, Fruktoz, AGE's, *Morus nigra*, Kuersetin

ABSTRACT

THE EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF LEAF OF BLACK MULBERRY (*Morus Nigra*) ON DNA GLYCATION

MSc THESIS
Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2018

Over the past 30 years, with the rise of sugar-added foods in both industrialized and developing countries, and with the increase in the consumption of sweetened beverages, a rapid increase in metabolic diseases has occurred. It is known that the widespread use of fructose as a sweetener enhances lipogenesis and intracellular lipid accumulation. One issue that arises in the pathogenesis of metabolic diseases associated with modern nutrition is the role of Advanced Glycation End Products (AGEs). AGEs not only affect metabolic control, but also affect global health. Reaction of DNA with sugar results in DNA-AGE formation. Glycation causes significant damage to DNA. Depurination of DNA causes mutations such as strand breakage, splicing, slime. DNA-AGEs for this reason; loss of genomic integrity during aging, cancer, neurological diseases and heart dammar diseases are among the most important causes of many diseases. It is known that the advanced glycation process plays an important role in the development of complications of diabetes mellitus.

In this thesis, we have studied the black mulberry (*Morus nigra*) leaf; The extinguishing activity of total phenolics, total flavonoids, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals of ethanol extracts prepared by soxlet, maceration and ultrasound methods was examined. The extract obtained with the soxhlet method showed the best activity in all the tested parameters. The extract obtained by this method was also examined for quenching activity of the hydroxy radical. It was also aimed to determine the inhibitory effects of oxidative DNA damage induced by fructose-derived DNA glycation and hydroxy radicals of ethanol extract of black mulberry leaves and quercetin, one of the active ingredients of the leaf. In the study, plasmid DNA (25μg / ml) with fructose (50 mM) was incubated at 37 ° C in sterile conditions throughout the day. Antigelling activities of ethanol extract of mulberry leaf (50-250 μg / ml) and quercetin (50-250 μg / ml) were investigated. Reaction product was characterized by fluorescence and UV spectroscopy, nitroblue tetrazolium (NBT) reduction analysis and electrophoretic study.

In a conclusion; the phenolic constents of 1 mg of *M. nigra* leaf ethanol extracts; we found to be 76.3 ± 0.003μg (GAE) gallic asid in soxhlet method ,64.4 ± 0.003 μg (GAE) gallic asid in maceration method and 54.8 ± 0.003 μg (GAE) gallic asid in ultrasound method. The flavonoid contents we found to be 143.94 ± 0.06 μg Quercetin (QUE) in soxhlet method, 138.62 ± 0.06 μg Quercetin (QUE) in maceration method and 105.33 ± 0.06 μg Quercetin (QUE)in ultrasound method.

Keywords: DNA Glycations, Fructose, AGEs, Black Mulberry Leaf, Quercetin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 1.1.	Maillard Reaksiyonu	1
Şekil 1.2.	Strecker Bozulması – Enolizasyon	2
Şekil 1.3.	Dikarbonil Ürünleri	3
Şekil 1.4.	İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs)	4
Şekil 1.5.	Floresans ve çapraz bağlı AGEs	4
Şekil 1.6.	Floresans olmayan ve çapraz bağlanmayan AGEs	5
Şekil 1.7.	Hemoglobinin glikasyonu	6
Şekil 1.8.	UV İle DNA Hasarı	8
Şekil 1.9.	Serbest Oksijen Detoksifiye Sistemi	9
Şekil 1.10.	Glutatyonun Oksidasyonu ve Redüksiyonu	10
Şekil 1.11.	NADPH Sentezine Bağlı Biyolojik Olaylar	11
Şekil 1.12.	AGE bağlayıcı reseptör	11
Şekil 1.13.	İleri Glikolizlenmiş Son ÜrünYolakları	12
Şekil 1.14.	Apürinik kısımların Oluşumu ve Guanin Bazının Glikasyonu	13
Şekil 1.15.	Glikasyonun erken basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri	17
Şekil 1.16.	Glikasyonun ileri basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri	18
Şekil 1.17.	Sentetik AGE İnhibitörlerinin Dikarbonillere Etkisi	19

Şekil 1.18.	AGE inhibitörlerinin antiglikasyon mekanizmaları	20
Şekil 1.19.	Fruktoz ve Glikoz Metabolizması	21
Şeki 2.1.	Kara Dut Yaprağı	25
Şekil 3.2.1.	Liyofilizasyon	28
Şekil 3.2.2.	Evaporasyon	29
Şekil 3.2.1.1.	Maserasyon Yöntemi	29
Şekil 3.2.1.2.	Sokslet Yöntemi	30
Şekil 3.2.1.3.	Ultrasound Yöntemi	31
Şekil 3.1.	DPPH Radikalinin İndirgenmesi	33
Şekil 3.2.	Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu	34
Şekil 3.2.7.	Diyaliz	34
Şekil 4.2.	Total Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktar Tayini	38
Şekil 4.3.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	39
Şekil 4.4.	OH Radikali Söndürme Aktivitesi	40
Şekil 4.5.1.	Floresans Spektroskopisi (360-500nm) - Total Floresans Yoğunluğu	41
Şekil 4.5.2.	Floresans Spektroskopisi (360-500nm) - % İnhibisyon	41
Şekil 4.6.1.	UV-Visible Absorbans Spektroskopisi (200-400 nm)	42
Şekil 4.7.1.	Fruktozamin Testi (DNA’ da Amadori ürünlerinin Tayini)	43
Şekil 4.7.2.	Fruktozamin Testi (DNA’ da Amadori ürünlerinin Tayini) - % İnhibisyon	43

Şekil 4.8.1.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA'nın Fruktozilasyonu	44
Şekil 4.8.2.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA–Sakkarin Sistemi	44
Şekil 4.9.1.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA-Fruktoz Sistemine *M.nigra* Yaprağının Etkisi (Diyaliz Öncesi)	45
Şekil 4.9.2.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA- Fruktoz Sistemine Kuersetinin Etkisi (Diyaliz Öncesi)	45
Şekil 4.10.1.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA-Fruktoz Sistemine *M.nigra* Yaprağının Etkisi (Diyaliz Sonrası)	46
Şekil 4.10.2	Agaroz Jel Elektroforezi DNA- Fruktoz Sistemine Kuersetinin Etkisi (Diyaliz Sonrası)	46
Şekil 4.11.	Agaroz Jel Elektroforezi DNA Oksidasyonuna *M.nigra* Yaprağı ve Kuersetinin Etkisi	47

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa No
Çizelge 4.1.	Kara dut yaprağı etanol ekstraktı (*M. nigra*) % verim	37
Çizelge 4.2.	*M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı içindeki toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktar tayini.	37

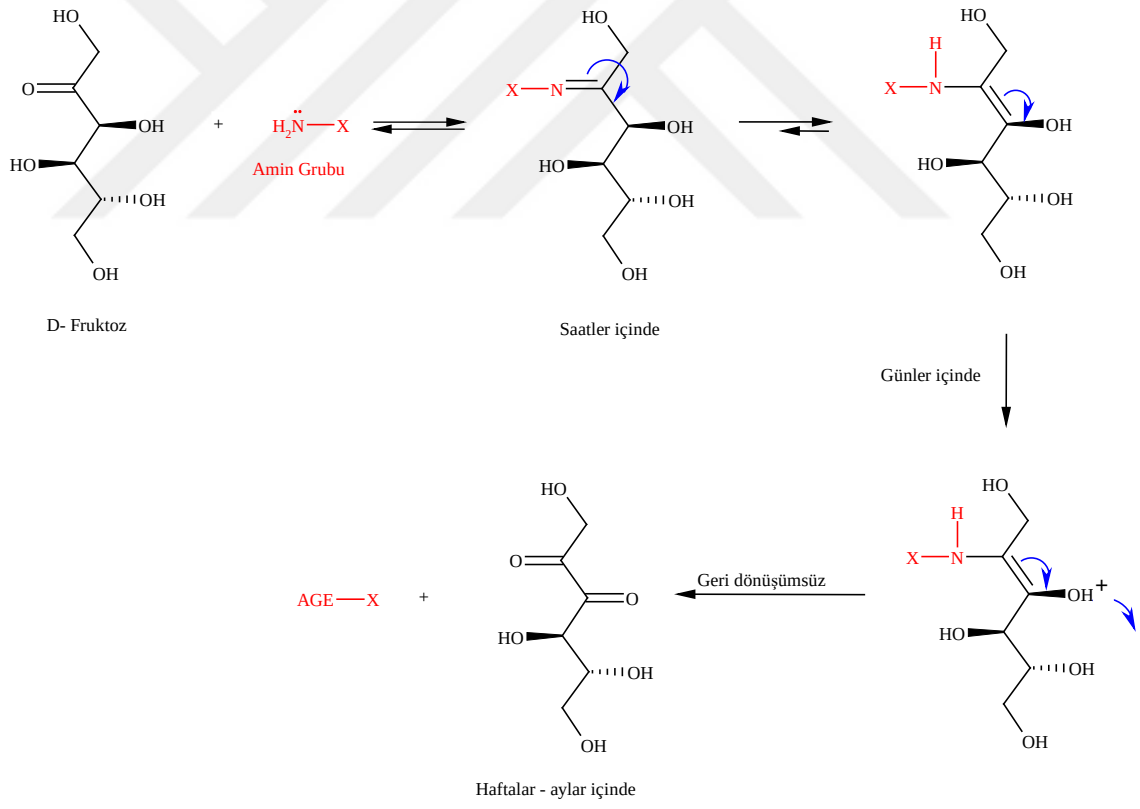
KISALTMALAR VE SİMGELER

AGEs	:Advanced Glycation end products
AG	:Aminoguanidin
BHA	:Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	:Bütillenmiş hidroksitoluen
CEL	:Karboksietil lizin
CML	:Karboksimetil lizin
3-DG	:3-deoksiglukazon
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DM	:Diabetes Mellitus
EDTA	:Etilendiamin tetra asetikasit
MDA	:Malondialdehit
GO	:Glioksal
MG	:Metilglioksal
RAGE	:Receptor for AGEs
RCS	:Reactive carbonyl species
ROS	:Reaktive oxygen species
TCA	:Trikloroasetik asit
Glc	:Glukoz
SOD	:Süperoksit dismutaz
GSH	:Glutatyon
QUE	:Quersetin
M. nigra	*:Morus nigra*
GAE	:Gallik asit
FRU	:Fruktoz
g	:gram
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
ml	:Mililitre
M	:Molar
mM	:Milimolar

1. GİRİŞ

1.1. Glikasyon

Karbonhidratların keto-aldehit grubu ile biyolojik makro moleküllerin (DNA, lipit ve proteinler) amin gruplarının enzimatik olmayan ve saatler süren reaksiyonları son derece kararsız schiff bazlarının oluşumu ile sonuçlanır. Oluşan shiff bazları; yeniden düzenlenme, dehidrasyon ve siklizasyon reaksiyonları ile günler içinde daha kararlı Amadori ürünlerini ve dikarbonil bileşiklerini oluşturur (bu basamağa kadar olan tüm reaksiyonlar geri dönüşümlü reaksiyonlardır). Hem schiff bazları hem de Amodori ürünleri ve dikarbonil bileşikleri Reaktif Oksijen Türlerini (ROT) ve haftalar/aylar sonunda geri dönüşümsüz olarak İleri Glikasyon Son Ürünlerini (Advanced glycation end products, AGEs) oluşturur (Watson ve ark. 2015) (Şekil 1.1.).



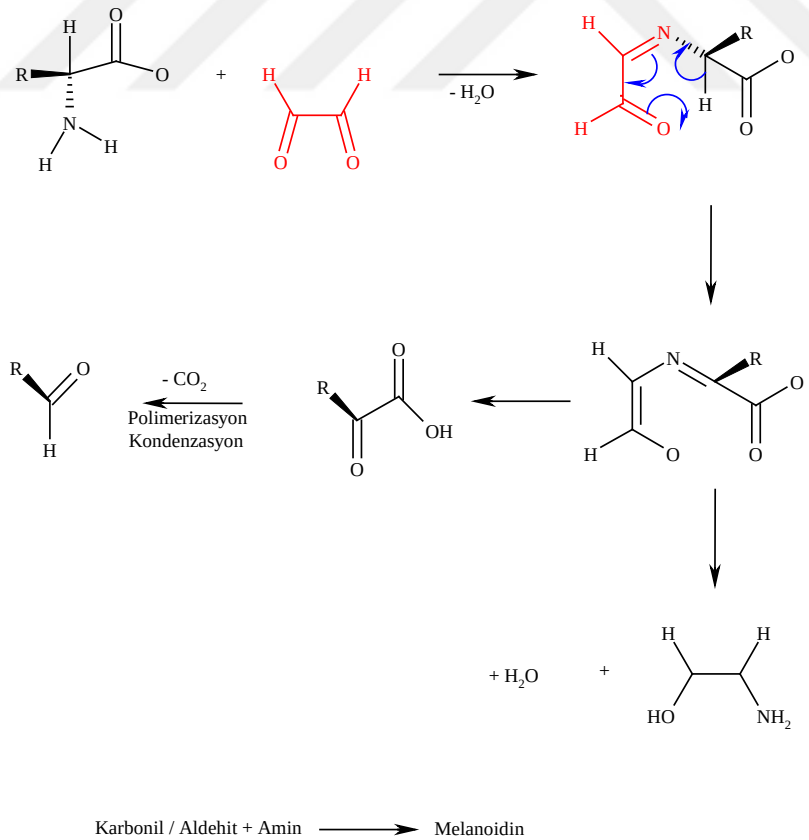
Şekil 1.1. Maillard Reaksiyonu

1.2. Amadori Ürünleri

Maillard reaksiyonu esnasında kararsız schiff bazlarının oluşumunun ardından Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünleri AGE'leri de oluşturabilir çok tehlikeli dikarbonil bileşiklerini de oluşturabilir (Bonnefont 2001).

Amadori ürünleri çeşitli sıralı reaksiyonlar sayesinde (enolizasyon ve strecker bozulması) aldehit türevi; melonoidinleri oluşturabilir.

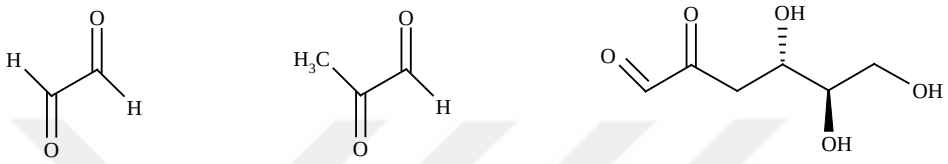
Besinlerin kuru sıcaklıkta ve hızlı pişirilmesi (ızgara, barbekü, kızartma…) işlemine glikasyon/browning- esmerleşme ya da karamelizasyon denir. Bu işlem yiyeceklerin lezzetini, kokusunu, rengini geliştirir fakat AGE'leri türlerinin oluşumunu hızlandırır. Isıtma işlemi yiyecek güvenilirliğini arttırırken katılma işlemleri ve besinlerdeki ana proteinlerin yapısının bozulmasına neden olabilir. Yiyeceklerde aroma oluşumunun ilk basamağı aldehit türevleri sayesinde olur. Bu basamak aynı zamanda Maillard reaksiyonunun üçüncü basamağıdır(Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. Strecker Bozulması–Enolizasyon

1.3. Dikarbonil Ürünleri

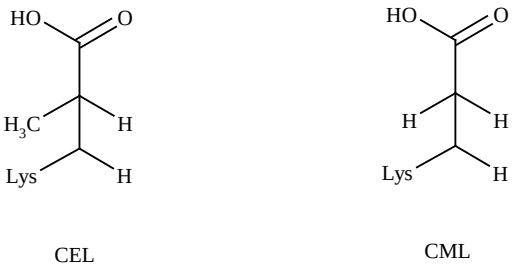
Reaktif dikarbonillerin birikimi karbonil stres olarak tanımlanır. Karbonil stres artıkça AGE oluşum miktarı buna bağlı olarak artar. Bu karbonil bileşiklerine örnek olarak glioksal, metilglioksal ve 3-Deoksiglukazonu verebilir (Şekil 1.3.). Dikarbonil türevleri beyinde birikerek Alzheimer hastalığına neden olabilir (Ames ve ark. 1993).



Şekil 1.3. Dikarbonil Ürünleri

1.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs)

İlk olarak 1968 yılında HbA1c'nin diyabetik hastalarda keşfi ile AGE araştırmaya başlanmıştır. Karbonhidratların aldehit/keto grupları ile ve amin grubuna sahip bileşiklerin enzimatik olmayan biyolojik modifikasyonu sonucu oluşmasının yanı sıra glikasyon esnasında oluşan Amadori ürünlerinin ROT ile indirek reaksiyonu sonucu oluşabilir (Şekil 1.4.).

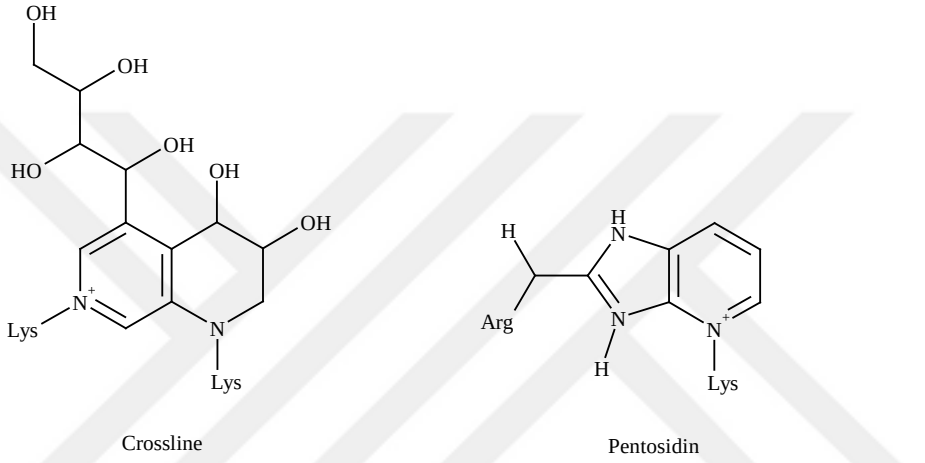


Şekil 1.4. İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glcation End Products, AGE'ler)

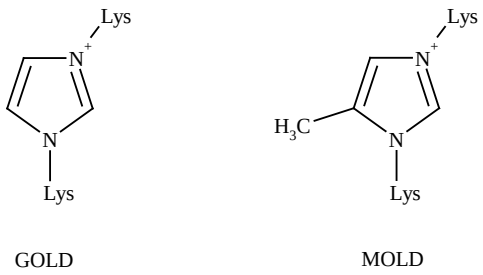
Heterojen yapıya sahip AGE'leri üçe ayrılır.

- Floresans Çapraz Bağlı AGE'ler (pentosidine,crossline)(Şekil 1.5.)
- Floresans Olmayan Çapraz Bağlı AGE'ler (MOLD)(Şekil 1.6.)
- Çapraz Bağ Yapmayan AGE'ler (karboksimetillizin)

AGE'lerin seviyesini anlamlı bir şekilde azaltmak için besinleri düşük sıcaklıkta, bol su ya da buharla kısa sürede pişirmek gerekir.



Şekil 1.5. Floresans ve çapraz bağlı AGE'ler



Şekil 1.6. Floresans olmayan ve çapraz bağlanmayan AGE'ler

1.5. AGE'lerin Hastalık Ve Yaşlanmadaki Rolü

1.5.1. Diabetus Mellitus

Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinir. Kandaki glikoz miktarının normal değerinin üzerine çıkması sonucunda glikoz olmaması gerektiği halde idrarda tespit edilir. Diyabetin belirtileri;

- Yorgunluk ve halsizlik
- Hızlı kilo kaybı
- Ağızda tat bozukluğu
- Yaraların geç iyileşmesi
- Bulanık görme

Diyabet; Tip I, Tip II, Yetişkinlerde Görülen Gizli Otoimmün, Ergenlikte Başlayan ve Gestasyonel Diyabet olmak üzere 5 çeşittir.

Tip I Diyabet: İnsüline bağımlıdır. İnsülin hormonunun pankreasta yeteri kadar üretilmemesi sonucunda oluşur. İnsülin hormonunu dışarıdan almak gerekir. Genellikle genetik faktörler sonucunda ortaya çıkar.

Tip II Diyabet: Kan glikoz seviyesini düzenleyen insülin hormonuna hücrelerin duyarsızlaşması sonucunda oluşur.

Yetişkinlerde Görülen Gizli Otoimmün Diyabet (LADA): Tip I benzeri bir hastalıktır. İmmün sistemin bozulması sonucunda insüline bağımlılık artar.

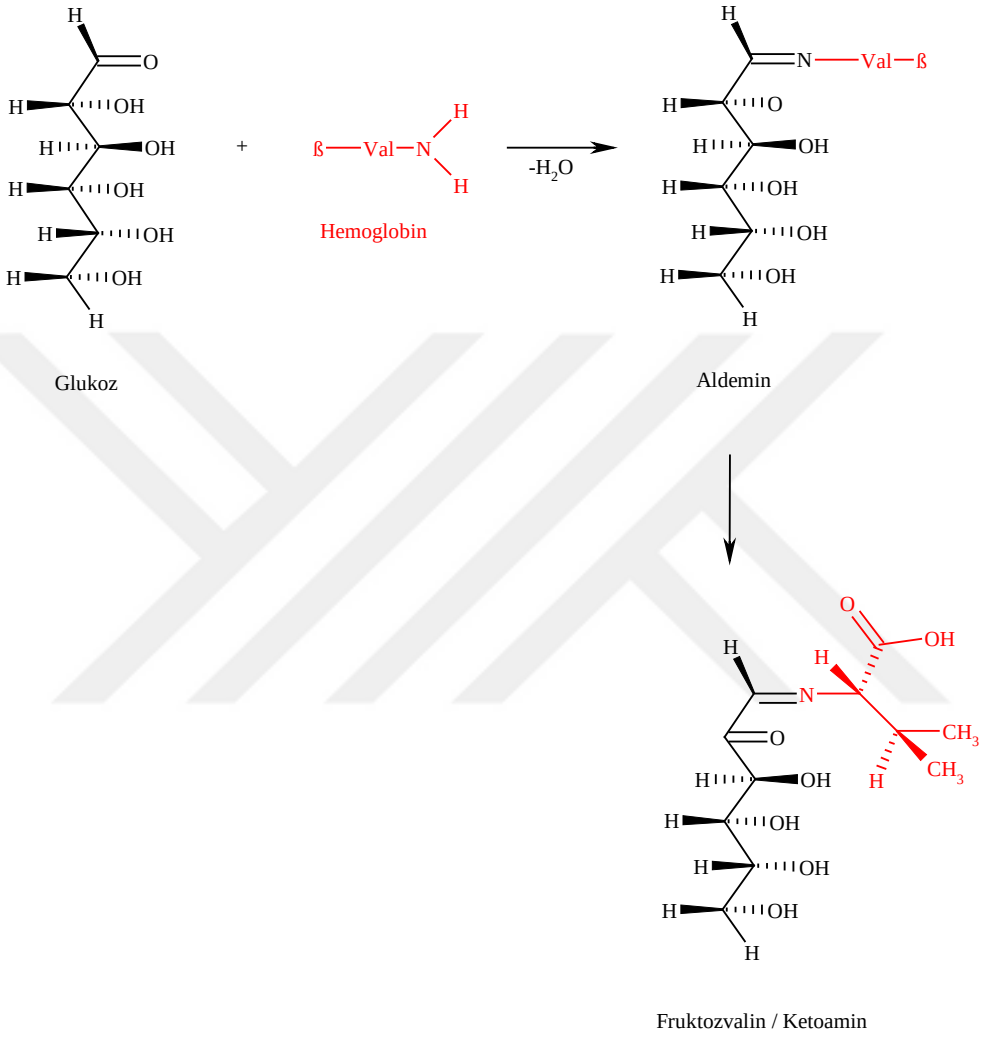
Erken yaşta görülen (MODY): Belirtileri ve nedenleri Tip II diyabete benzer.

Tüm diyabetik hastalarda ve özellikle gençlerde HbA1c düzeylerini izlemek önemlidir. Hiperglisemi, genel protein glikasyonuna neden olur ve protein çapraz bağlamalara yol açar. Zaman içinde felaketle sonuçlanacak fizyolojik etkinliklere neden olur (Kim ve ark. 2004). HbA1c izleme insülin bağlılığın bir göstergesidir. HbA1c bir ileri glikasyon son ürünüdür (Şekil 1.7.).

Normal koşullarda yiyecek alımı sonrası glikoz yapımı baskılanmaktadır. Ancak tip II diyabetli hastalarda baskılanma ortadan kalkmaktadır.

Organizmadaki yüksek glikoz konsantrasyonunda glikozun keto-aldehit grubuyla dolaşımdaki veya dokulardaki proteinlerin amin grupları reaksiyona girerek Maillard reaksiyonunu gerçekleştirebilirler.

AGE'leri diyabet sınıflarında çeşitli kompleks kararsız yapılar oluşturabilir. AGE formasyonu hiperglisemiyi hızlandırabilir.



Şekil 1.7. Hemoglobinin glikasyonu

1.5.2. Böbrek Rahatsızlıkları

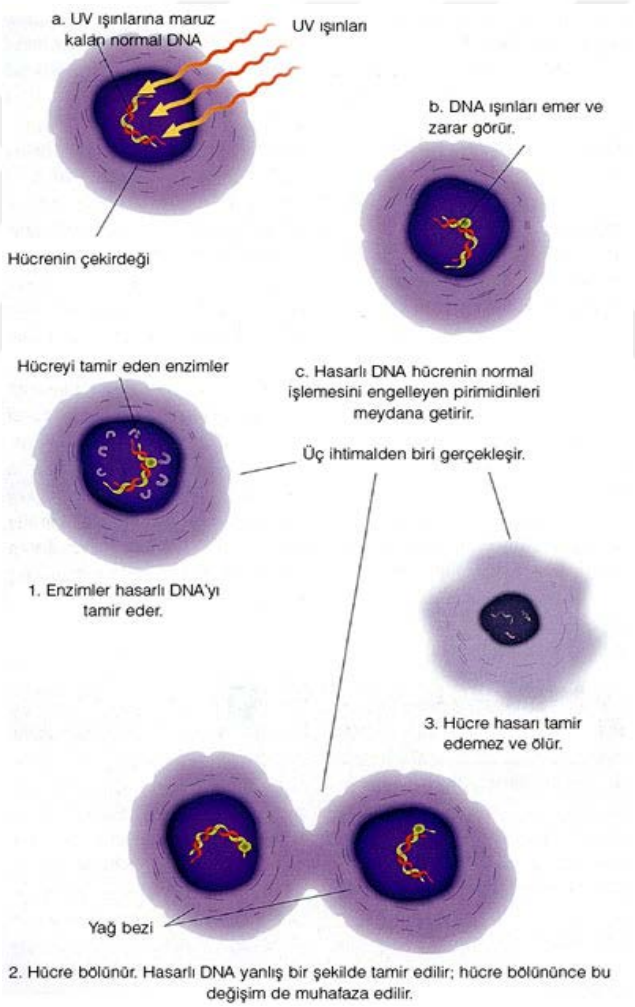
Ekzojen AGE'lerin %10' u sindirilir. Sindirilen AGE'lerin 2/3' ü dokularda kovalent bileşenleriyle kalır. Geri kalan 1/3' ü ise böbreklere gider. Burada vücuttan atılabilir veya böbrek fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Son evre böbrek rahatsızlıklarında doku ve serumdaki AGE miktarı artmaktadır (Cerami ve ark. 1997).

1.5.3. Göz, Cilt Rahatsızlıkları ve Yaşlanma

Derideki glikolizlenmiş proteinler fotoaktif olarak, foto-yaşlanma ve foto-kanserde eşit derecede işlev görürler. Eğer UV aktif ürünler gözdeyse; göz rahatsızlıklarını, deride ise cilt rahatsızlıklarını tetikleyebilir ya da oluşturabilirler (Böhm ve ark. 2012).

1.5.4. AGE'lerin Deri Ve Yaradaki Etkisi

AGE'leri ciltteki elastikliği zayıflatarak yaşlanmayı aktif hale getirir. Eğer deriye yakınsa deri kanserine sebep olur. UV ile aktifleşerek proteinleri modifiye edip yine DNA hasarına neden olur (Böhm ve ark. 2012).



Şekil 1.8. UV İle DNA Hasarı

Derideki glikolizlenmiş proteinler fotoaktif olarak, fotoyaşlanma ve fotokanserde eşit derecede işlev görürler (Şekil 1.8.).

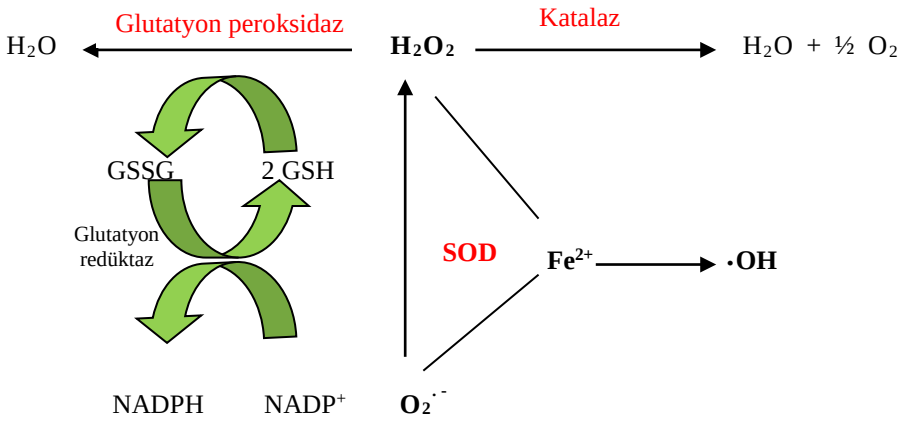
Glikasyonun hedeflediği proteinler; kollajen, LDL ve hemoglobindir. AGE'ler çapraz bağlanarak kolajeni zayıflatıp cildin esnekliğini kaybetmesine, cilt kalınlığının azalmasına, kaslarda kasılmanın oluşmasına ve yara kapanma süresinin uzamasına neden olabilir. Lipoproteinlere bağlanarak ateroskleroza (damarlarda sertliğe) neden olabilir.

1.6. Glikotoksinler

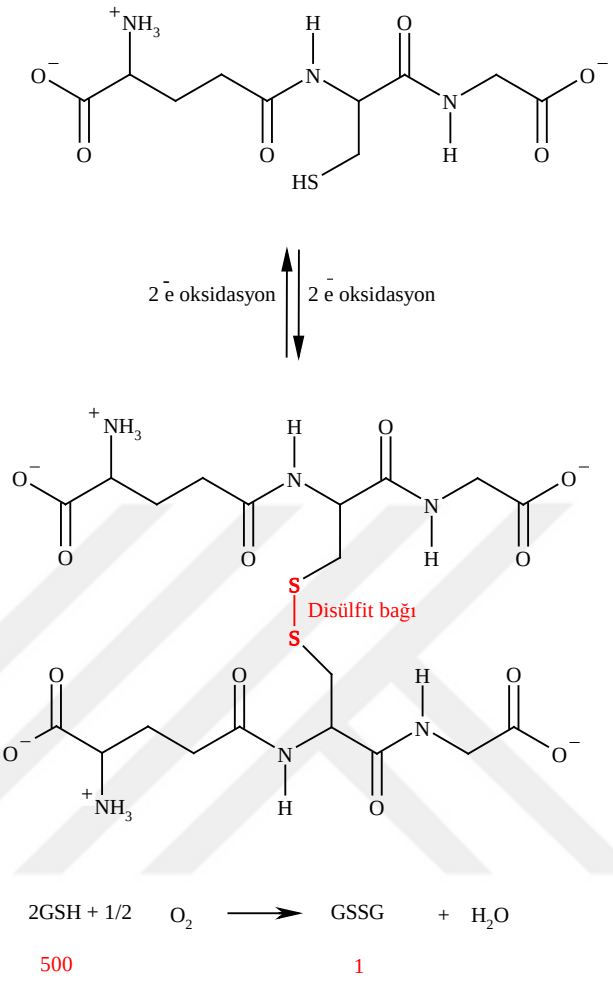
AGE'lerin oluşumu sadecede endojen değildir. Vücuda hazır alınabilir. Buna ekzojen AGE'ler ya da glikotoksinler denir. Yüksek ve kuru sıcaklıkta pişirilmiş gıdalar (bebek mamaları, ekmek, bira) tütün yaprağı, sigara dumanı uzun vadede aşırı AGE'lerin üretilmesine neden olur. Ekzojen AGE'lerden sigara dumanı, alveollerde birikip burada hasara neden olabilir ya da alveollerden kana karışarak başka hedef bölgelerle etkileşebilir.

1.7. ROT (Reaktif Oksijen Türleri)

Kimyasal yapısı nedeniyle normal oksijen molekülü ile karşılaştırıldığında yüksek kimyasal reaktifliğe sahip oksijen formlarıdır. Reaktif oksijen türlerinin, yaşlanmada ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların çoğunda önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. Serbest Oksijen Detoksifiye Sistemi



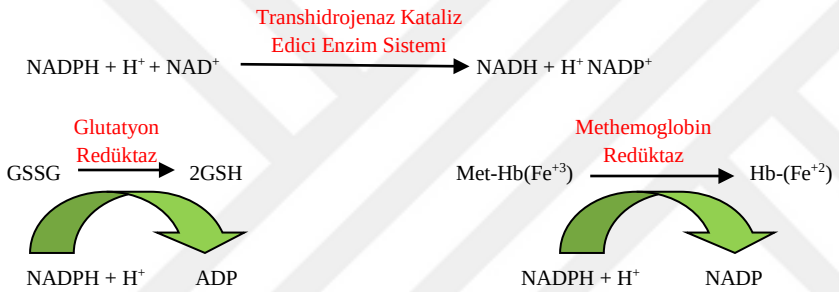
Şekil 1.10. Glutatyonun Oksidasyonu ve Redüksiyonu

1.8. Glutatyon

Serbest radikalleri söndüren sisteme antioksidan sistem denir. Glikasyon esnasında oluşan serbest radikalaller; antioksidan savunma mekanizmalarının düşüşüne, hücre organellerine ve enzimlere zarar verirler. Böylece oksidatif-kronik stres ve AGE'lerin (advanced glycation end-products) birikimi; başta diyabet, ateroskleroz, Alzheimer ve kanser gibi yaşam kalitesini /süresini azaltan hastalıkların oluşmasına ve gelişmesine neden olur. Glutatyon, oksidasyon ajanlarını söndürür. Oksidasyon ajanları, birçok hastalığın oluşmasında, gelişmesinde ve yaşlanmanın hızlanmasında rol alır.

Hemoglobini korur. Oksitleyici ajanlara karşı S-H grupları indirgeyici özellikte olup hemoglobinin okside olmasını önler. Glutatyon; ilaçların, kimyasalların, pestisitlerin aşırı miktarda tüketilmesi sonucu tükenir. Geri dönüşümsüz olarak zarar görür (Şekil 1.10.).

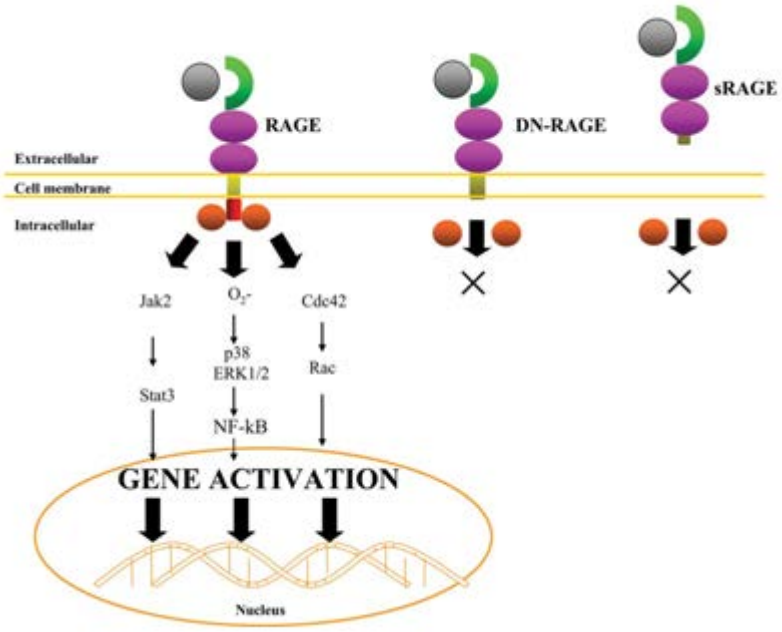
Glukoz 6P dehidrojenaz enzimi pentoz fosfat yolunun ilk düzenleyici enzimidir. Eğer hücrede bu enzim ile ilgili bir problem varsa NADPH sentezi ve ona bağlı metabolik olaylar yavaşlar. Bu durumda hücre daha fazla hayatta kalamaz. Eğer eritrositlerde NADPH sentezi yapılmazsa glutatyon seviyesi düşer. Redükte glutatyon azlığından hemoglobin korunamadığından –SH gruplarından oksitlenir. Proteinler denatüre olur ve eritrositler hemolize olur (Şekil 1.11.).



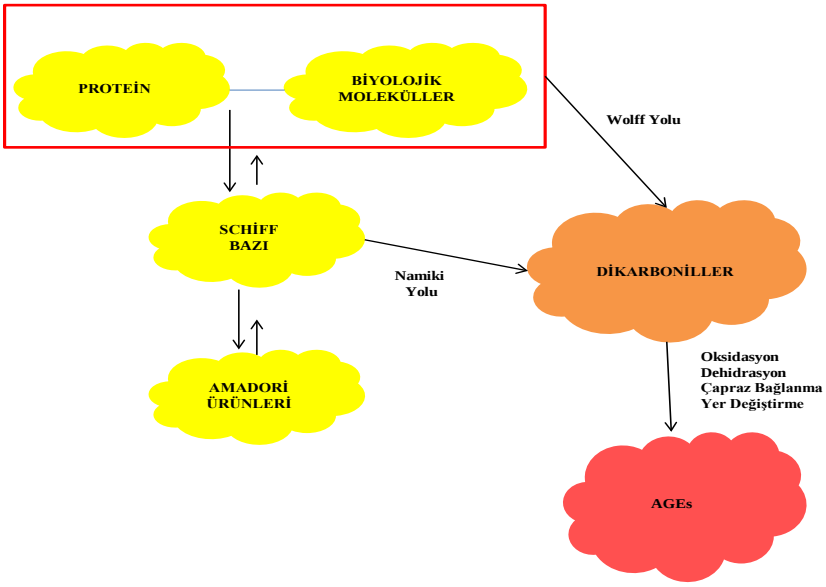
Şekil 1.11. NADPH Sentezine Bağlı Biyolojik Olaylar

1.9. RAGE (AGE Bağlayıcı Reseptör)

Hücre yüzeyindeki AGE'ler RAGE'e (AGE bağlayıcı reseptör) bağlanıp çeşitli sinyal yolaklarında aktivasyona sebep olarak metabolik değişikliklere neden olabilir (Şekil 1.13.). RAGE' ler düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerde bulunabilir (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. AGE bağlayıcı reseptör

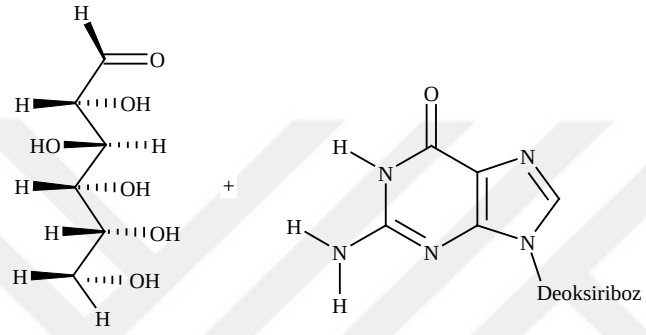


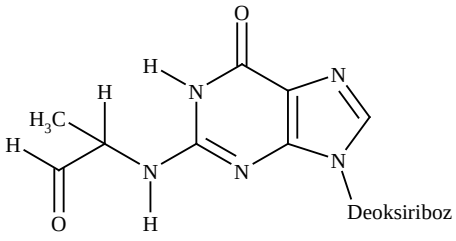
Şekil 1.13. İleri Glikolizlenmiş Son ÜrünYolakları

1.10. DNA' nın Glikasyonu

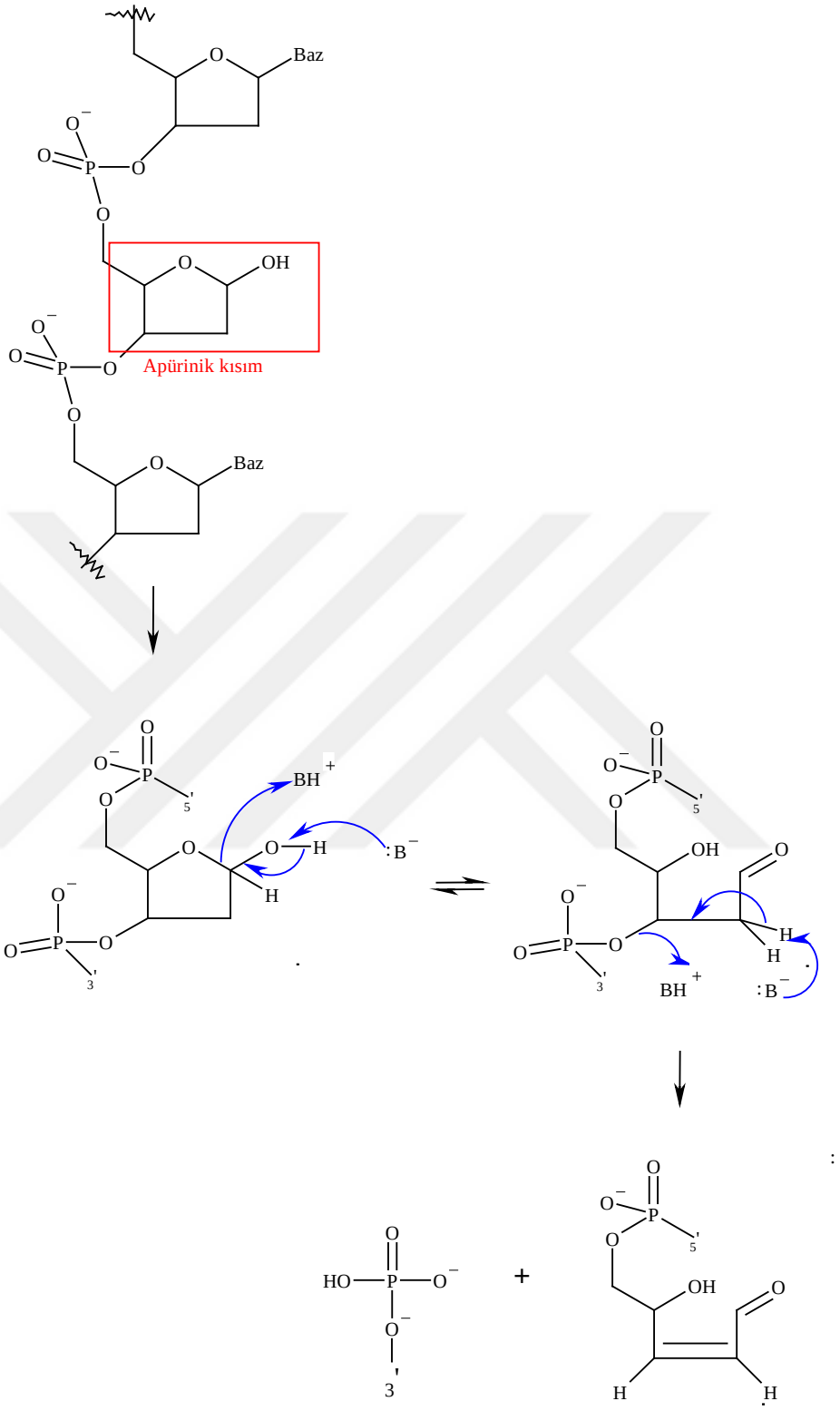
DNA'nın şeker ile reaksiyona girmesi DNA-AGE oluşumu ile sonuçlanır. Glikasyon DNA'ya önemli derecede hasar verir (Şekil 1.14).

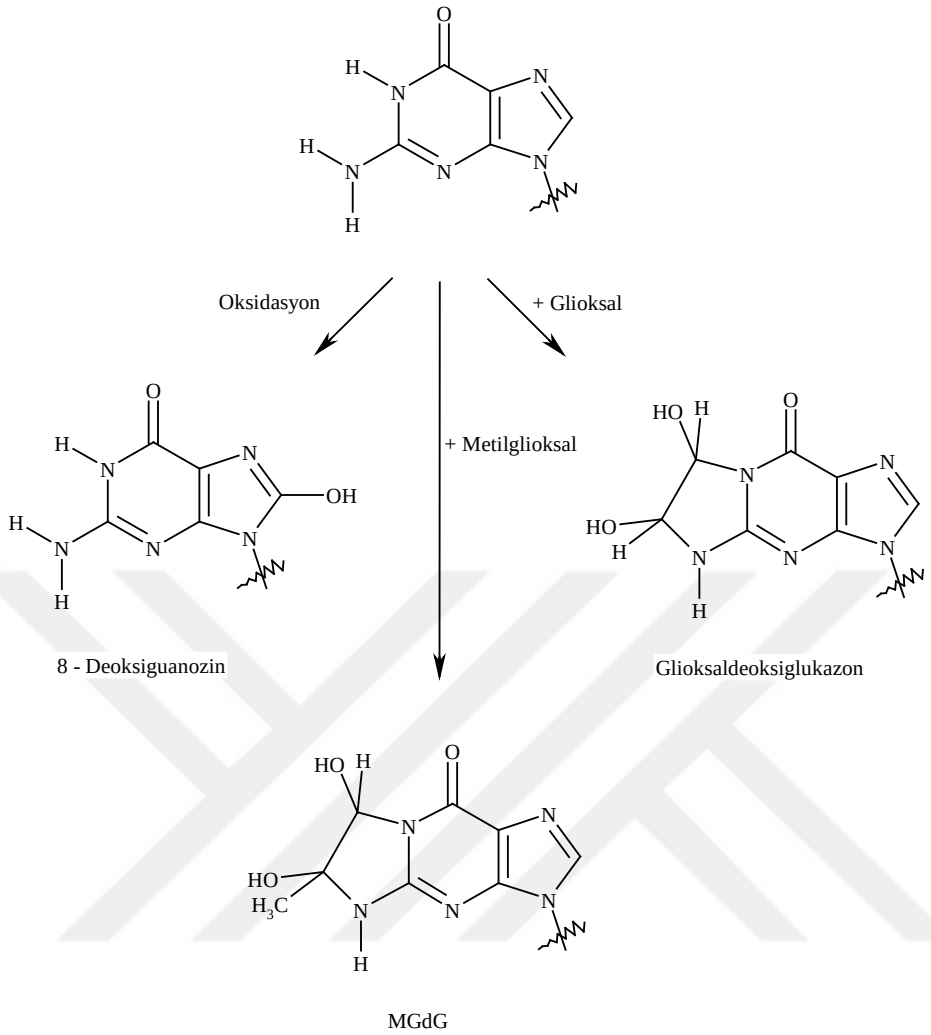
DNA'nın depürinasyonu, iplikçik kopması, ekleme ve silme gibi mutasyonlara neden olur. Bu nedenle DNA-AGE'leri; yaşlanma sırasında oluşan genomik bütünlüğün kaybedilmesi, kansere ve başka hastalıklara neden olabilir (Wani ve ark. 2012).





CEdG


Baz
OH
Apürinik kısım
Baz
BH +
:B −
OH
BH +
:B −
HO
OH
H
H



Şekil 1.14. Apürinik kısımların Oluşumu ve Guanin Bazının Glikasyonu

1.11. AGE İnhibitörlerinin Antiglikasyon Mekanizmaları

1.11.1. Doğal Ürünlerden AGE İnhibitörleri

Çok eski yıllardan beri hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanılmakta olup, günümüzde bitki içerikli ilaçlara yönelim artmıştır.

Sentetik ürünlerin sağlığa zararlı yan etkileri ve bitkilerin kolay elde edilebilir olmaları, bu yönelimin başlıca sebepleri olarak görülmektedir.

Halk arasında değişik hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan birçok bitkinin, kullanım amacına uygun olup olmadıklarının saptanması amacıyla tüm dünyada çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaktadır.

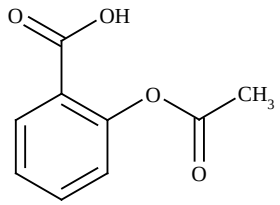
Bazı bitki ekstraktlarının veya fraksiyonlarının veya bileşiklerinin AGE oluşumunu üzerine inhibisyon aktiviteleri son yıllarda çalışılmaktadır.

Bitkilerin yapısında bulunan fenolik bileşiklerin antiglikasyon aktiviteleri araştırılmıştır. Antiglikasyonun sürecinde, antioksidantların en yaygın etki mekanizması serbest radikalleri söndürmesidir.

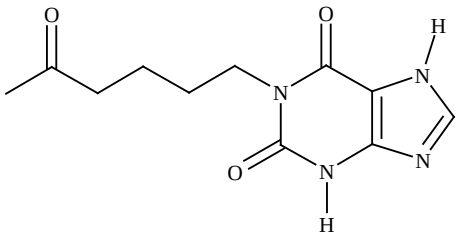
Vitamin C ve E, karetenoid, selenyum ve fenolik bileşen olarak antosiyanin, flavanoid, katekin ve lipoik asit içeren gıdalar antioksidant bakımından da zengindir. Bu bileşenler meyve ve sebzelerde (vitamin C, antosiyanin, flavanoid), kabuklu yemiş tohumları ve yağlarında (vitamin E), şarap ve çikolatada (flavanoid), ıspanak, karaciğer, brokoli ve patateste (lipoik asit) bulunmaktadır (Wu ve ark. 2011).

1.11.2. Sentetik AGE İnhibitörleri

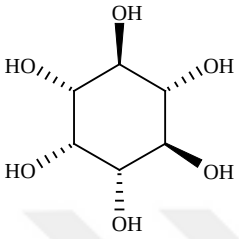
Sentetik AGE inhibitörlerinden bazıları glikasyonun erken basamaklarında, reaksiyona müdahale ederek schiff bazı ve AGE'lerin oluşumunu inhibe ederler (Şekil 1.15.). Örneğin aspirin diğer adıyla asetilsalisilik asit proteinin serbest amino grubunu asetilleyerek glikasyonu engeller ve diyabetin ileri komplikasyonlarını önler (Malik ve ark. 1994).



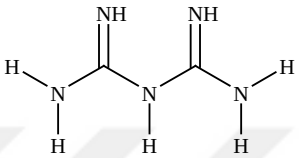
Asprin



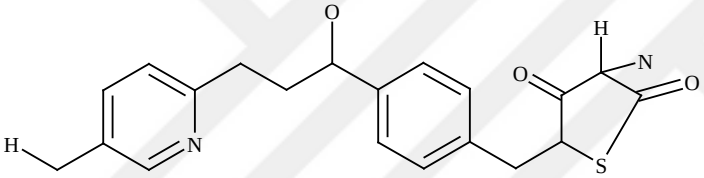
Pentoksifilin



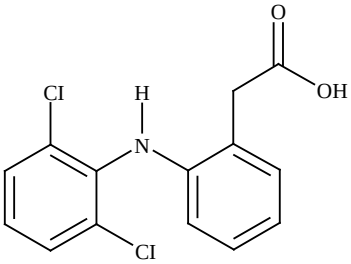
İnisitol



Metformin



Pioglitazon

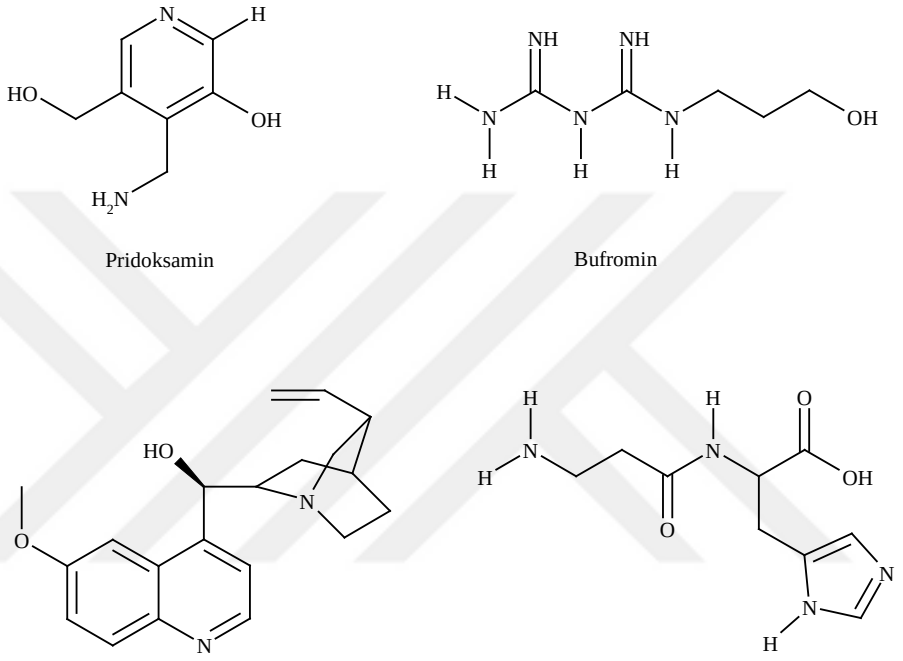


Diklorofenak

Şekil 1.15. Glikasyonun erken basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri

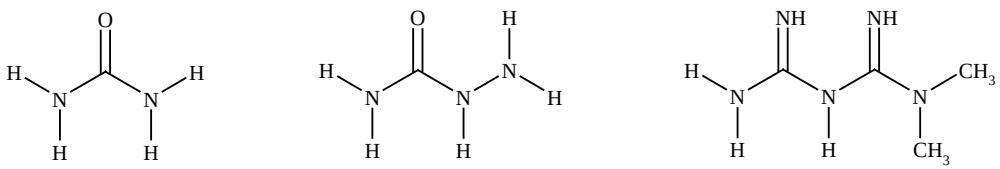
Anti-inflamatuar ilaç olan Diklofenac proteinle örneğin serum albumin ile non-kovalent bağlanma yaparak, proteini indirgen şekerin saldırısına karşı koruyarak glikasyonu engeller (Van Boakel ve ark. 1992)(Şekil 1.16.).

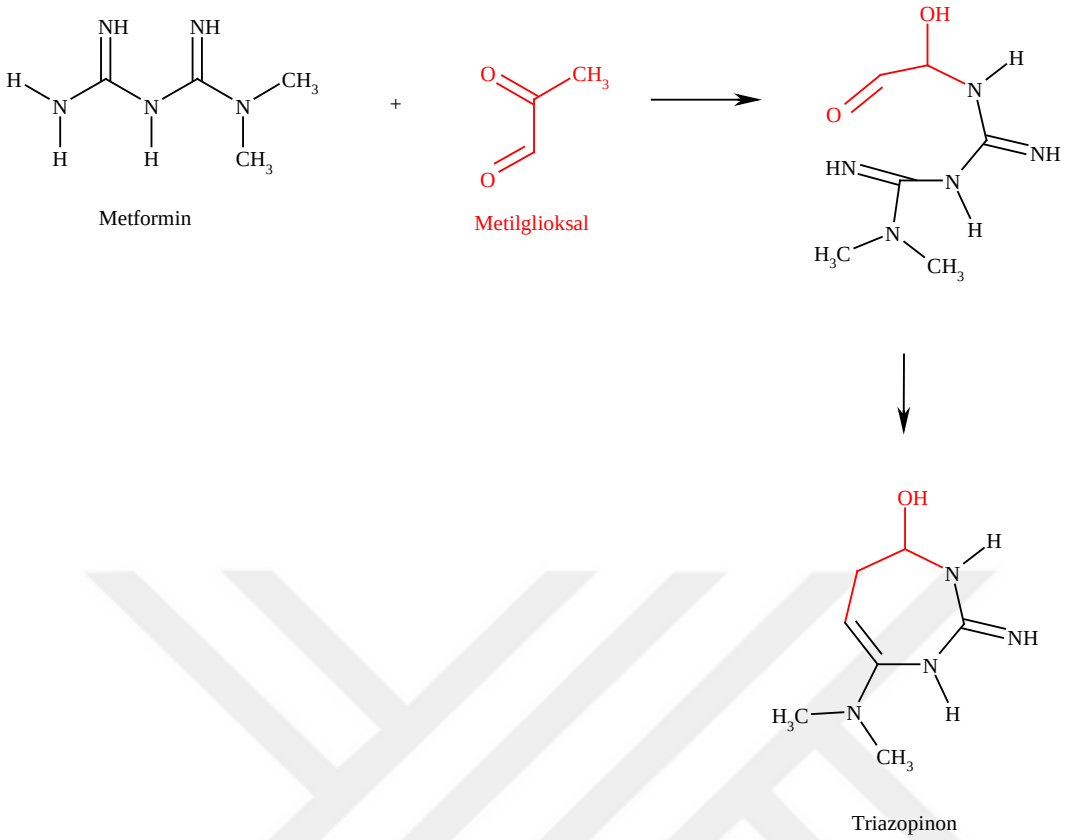
İnositol antiglikasyon özelliğe sahiptir, insan lens proteinlerinin glikasyonunu % 57-67 azaltmaktadır (Ramakrishnan ve ark. 1999).



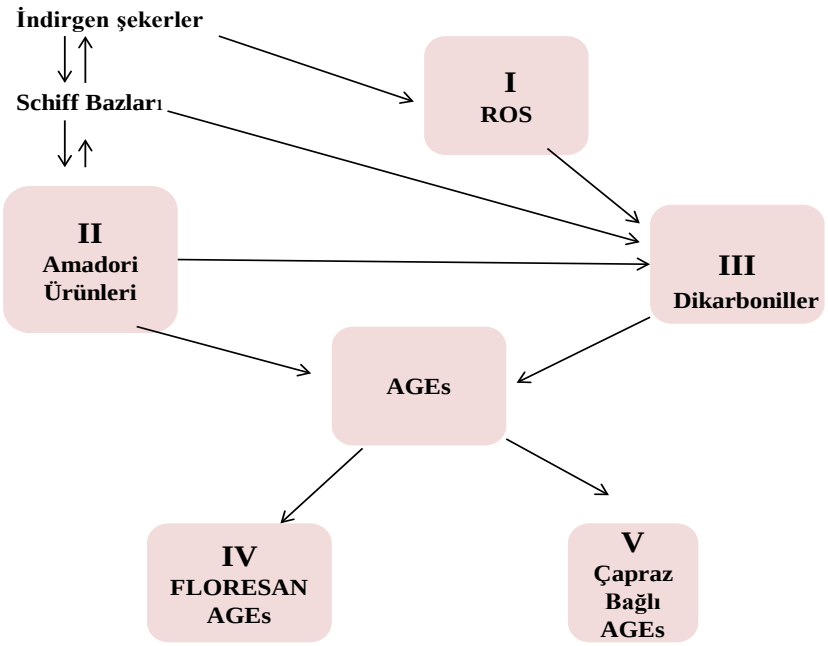
Şekil 1.16. Glikasyonun ileri basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri

Metformin, pioglitazon ve pentoxifyllin gibi bazı AGE inhibitörleri glikasyonun erken basamaklarında ılımlı inhibisyon gösterirler (Rahbar ve ark. 2000) (Şekil 1.17.).





Şekil 1.17. Sentetik AGE İnhibitörlerinin Dikarbonillere Etkisi

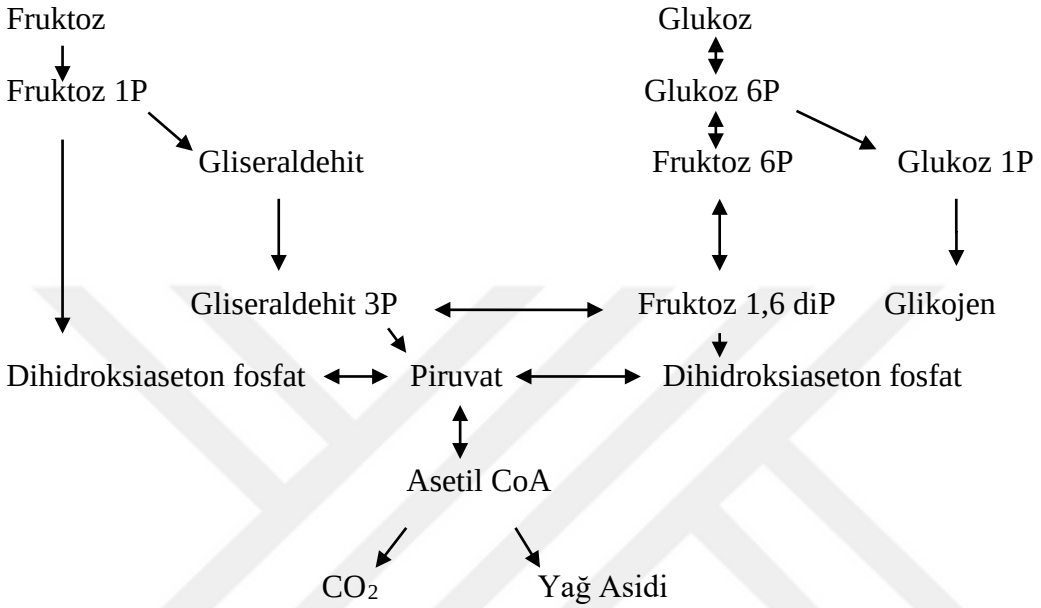


Şekil 1.18. AGE inhibitörlerinin antiglikasyon mekanizmaları

Tip I inhibitörler, ROT oluşumunu inhibe eder glikooksidatif hasarları önler. Tip II inhibitörler, Amadori ürünlerinin oluşumunu engeller böylece glikasyonun ilk basamağını önlemiş olur. Tip III inhibitörler Reaktif karbonları söndürürler. Tip IV ve Tip V inhibitörleri glikasyonun son aşamalarında oluşan floresans AGE ile çapraz bağlanır ve AGE oluşumunu engelleyebilir (Şekil 1.18.).

1.12. Neden Fruktoz

Dünyada özellikle ABD'nde yaygın olan obezitenin temel nedenlerinden biri fruktoz/glikoz (mısır) şurubudur. Aşırı-kontrolsüz miktarda karbonhidrat alımı Maillard Reaksiyonuna neden olmaktadır.



Şekil 1.19. Fruktoz ve glikoz metabolizması

Sterik etki reaksiyonların gerçekleşmesi için önemli bir etkendir. Fruktoz bir ketoz olmasına rağmen ve glikozla aynı kapalı formüle sahip olmasına rağmen glikasyonda daha aktif rol oynar . İnsülin glukozun piruvata hepatik dönüşümü düzenler. Fruktozun ise trioz-fosfata dönüşümü insülinden bağımsız olarak gerçekleşir. Yani fruktoz, glikolizin temel düzenleyici basamağı yani fosfofruktokinaz basamağını atlayarak glikolitik yola girer. Yani fruktoz fizyolojik pH'da glikozdan daha hızlı halkasal formunu kaybedip lineer forma geçer. Bu özelliğinden dolayı daha iyi bir glikasyon ajanıdır(Şekil 1.19.).

1.13. Antioksidantlar

En etkin fitokimyasal biyoaktifler olan "fenolik bileşikler" ve fenoliklerin birer grubu olan flavonoidler ve stilbenler, birçok meyvenin, sebze ve bitkisel ürünün önemli minör bileşenleridir.

Fenolik bileşiklerin büyük grubunu oluşturan flavonoidler dokuz kısma ayrılmaktadır: Flavonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, antosiyanidinler, antosiyaninler, flavononoller ve şalkonlar. Flavonoid antioksidan bileşikler, fenol kimyasal yapılı olup, bünyelerinde polar olan hidroksil (–OH) sübstitüe gruplarını içeren biyoaktif bileşiklerdir (Tokuşoğlu 2016).

1.14. Çalışmanın Amacı, Önemi Ve Hedefleri

1.14.1. Çalışmanın Amacı

Çalışmada DNA'nın fruktoz ile glikasyonu sonucu DNA'da oluşabilecek hasara karşı *M.nigra* (siyah dut) yaprağı etanol ekstraktı ile önleme etkisi araştırıldı. Siyah dut ülkemizde yaygın bulunan bir bitki türüdür bu nedenle ulaşılması oldukça kolaydır. Siyah dut yaprağından elde edilebilecek öncü madde sentetik ilaçtan daha ucuz olacaktır. Bu da ucuz ve kolay bir tedaviyi beraberinde getirecektir. Elde edilecek sonuçlar literatüre katkı sağlayacaktır. Bu amaçla;

- Karadut (*M. nigra)* yapraklarının etanol ekstraktının toplam fenolik, flavonoid, DPPH, hidroksi radikalini söndürme aktivitesini belirlendi.
- Fruktoz ile DNA'da hasar oluşturuldu.
- Diyaliz ile DNA'ya bağlanmamış şekerler uzaklaştırıldı.
- Yaprağın ana etken maddelerinden biri olan kuersetinin ve *M. nigra'*nın DNA-Fruktoz sistemi ve DNA Oksidasyonuna etkisi araştırıldı.
- NBT testi ile glikasyonun erken aşamasında oluşan dikarbonil ürünleri belirlendi.
- UV-Visible Absorbans Spektroskopisi ile doğal ve glikole olmuş DNA'nın Absorbans aralığına bakıp hiperkromisiteleri ölçüldü.
- Floresans Spektroskopisi ile doğal ve glikole olmuş DNA'nın floresans yoğunlukları incelendi.

1.14.2. Çalışmanın Önemi

AGE'ler; protein ve lipid gruplarını modifiye eder. Glikasyon esnasında oluşan reaktif oksijen türleri ileri glikasyon son ürünleri aracılığıyla antioksidan sistemi bozar. Böylece oksidatif-kronik stres; başta diyabet ve kanser olmak üzere çoğu hastalığa neden olur.

DNA'nın şeker ile reaksiyona girmesi DNA-AGE oluşumu ile sonuçlanır. Glikasyon DNA'ya önemli derecede hasar verir. DNA' nın depürinasyonu, iplikçik kopması, ekleme ve silme gibi mutasyonlara neden olur. Bu nedenle DNA-AGE' leri; yaşlanma sırasında oluşan genomik bütünlüğün kaybedilmesi, kansere ve başka hastalıklara neden olabilir (Bucala R. Ve ark 2012).

Morus nigra L. (Moraceae) geleneksel tıpta çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Kara dut içeriğinde major organik asit sitrik asit olup bunun yanı sıra malik asit ve askorbik asit bulunmaktadır. Kara dut meyvesinin antioksidan kapasitesi (oksijen radikal absorbans kapasitesi) (ORAC) 13.95-16.01 μmol/g arasında değişmektedir. Diğer meyvelere göre O_2, H_2O_2 ve OH radikallerine karşı en yüksek inhibisyon etkisine sahiptir.

Bu sebeple bu tez kapsamında DNA-fruktoz sisteminde antidiyabetik, antikanser, antioksidant özellikleri olduğu bilinen Kara dut yapraklarının fruktoz kaynaklı DNA hasarı üzerine etkisini çalışmayı amaçladık.

1.14.3. Çalışmanın Hedefleri

Bitkisel kaynaklardaki ilaç öncü maddeleri; sentetik kaynaklara gore, daha ucuz ve daha az yan etkiye sahip olduğundan dolayı yapılan çalışmalar neticesinde Fruktoz-DNA sisteminde, *M. nigra* yaprağı ve kuersetinin, glikasyonu hangi aşamasında hangi yöntemle inhibe edeceğini belirleyerek doğal kaynaklardan yeni AGE inhibitörleri geliştirmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İleri glikasyon sürecinin diabetes mellitusta, komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu konuda yapılmış araştırmalarda daha çok protein glikasyonu çalışılmıştır. DNA glikasyonu konusunda ise sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur (Qadir ve ark. 2014).

Karadut, Moraceae ailesine ait çiçekli bir bitkidir. 40 cins ve 1400 türden oluşmaktadır (Mallhi ve ark. 2014)

‘’Siyah dut’’ veya ‘’vahşi dut’’ olarak bilinen *Morus nigra L.* Afrika, Güney Amerika ve Asya’da bulunur. Çin Sağlık Bakanlığı tarafından 2002 yılında yalnızca gıda değil ilaç olarak ta düşünülmüştür (Tag 2015).



Şekil 2.1. Karadut *(Morus nigra)* ve yaprağı

Geniş tıbbi kullanım alanına sahiptir (Naderi ve ark. 2004). *Morus nigra* yaprakları Avrupa’da Diyabette insülin uyarımı için kullanılmaktadır (Ode 2000). *Morus nigra*; diyabet, kolesterol, kardiyovasküler problemler, obezite ve gut tedavisinde kullanılır (Chen ve ark. 2016). Antimikrobiyal (Ercisli ve ark. 2007), antikanser (Ercisli ve ark. 2010) hepatoprotektif (Mallhi ve ark. 2014) ve molluskisidal (yumuşakça öldürücüler) (Shahab ve ark. 2014) aktivitelerine sahiptir.

Biyomembran ve biyomoleküllerin peroksidatif hasarına karşı koruyucu etki (ve ve siyah dut meyvelerinde bulunan toplam flavonoidler, anti-inflamatuar ve analjezik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Ercisli ve ark. 2010)

Karşılaştırmalı çalışmalarda, karadut diğer dut çeşitlerine (beyaz ve kırmızı) göre daha yüksek konsantrasyonda fenolik bileşen (1422 mg/g) ve flavanoid (276 mg/g) konsantrasyonuna sahiptir (Ercisli ve ark. 2007)

Yenilebilir doğası, kolay erişebilirliği ve ekonomik faktörü nedeniyle *Morus* nigra biyolojik aktif bileşikler için iyi bir kaynak olabilir (Mallhi ve ark. 2014)

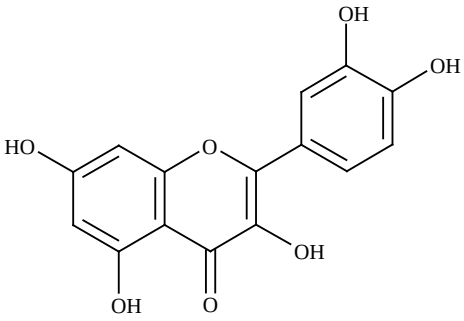
Potansiyel anti-obezite ve anti-diyabetik ve serbest radikal süpürücü etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Ahmad ve ark. 2007)

Son zamanlarda, yüksek biyoaktif içeriği nedeni ile *Morus nigra'nın* diğer dut türleri arasında en sağlıklı meyve olduğuna inanılıyor (Ercisli ve ark 2007)

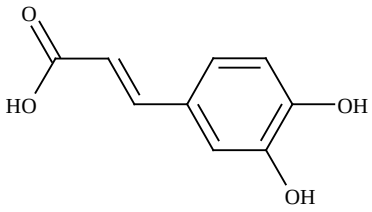
Siyah dut önemli doğal antioksidan özelliklere sahip biyo-flavonoidleri ve aynı zamanda antosiyaninleri de içerir. Dut yaprağının farmakolojik özelliklerinden bu biyoaktif moleküllerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Ashraf ve ark. 2012)

Dut meyvesi yüksek konsantrasyonda potasyum minerali içermektedir. Meyvede en yüksek konsantrasyona sahip antosiyanin siyanidin-3-glikozid olup kamferol-3-O-rutinozid, kuarsetin-3-O-glikozid, kuarsetin-3-O-rutinozid, siyanidin-3-soforozid, pelargonidin-3-glikozid ve pelargonidin-3-rutinozid bulunmaktadır. Meyvede major flavan-3-ol monomer (+)-kateşin'dir. Gallik, kafeik, *p*-kumarik, *m*-kumarik, *o*-kumarik, vanilik ve ferulik asitler meyve fenolik asitlerini oluşturmaktadır. Meyve major olarak rutin ve quersetin flavonollerine sahiptir (Islam ve ark. 2015)

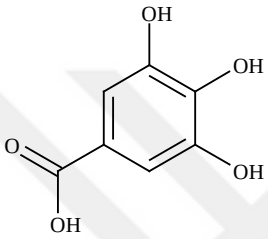
Karadut içeriğinde major organik asit sitrik asit olup bunun yanı sıra malik asit ve askorbik asit bulunmaktadır. Karadut meyvesinin antioksidan kapasitesi (oksijen radikal absorbans kapasitesi) (ORAC) 13.95-16.01 µmol/g arasında değişmektedir. Diğer meyvelere göre O_2, H_2O_2 ve OH radikallerine karşı en yüksek inhibisyon etkisine sahiptir (Ercisli ve ark. 2010).



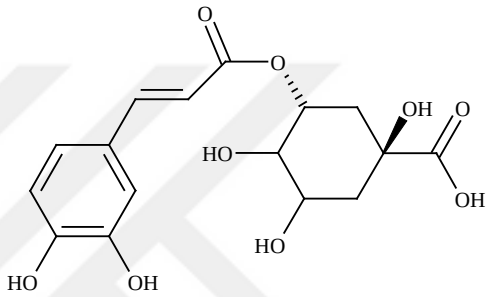
Kuersetin



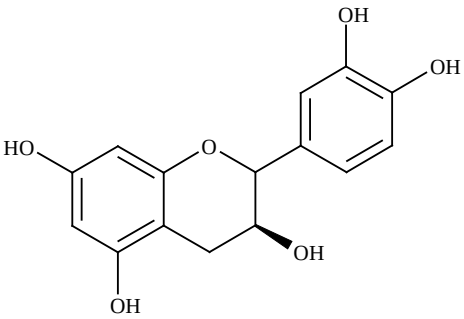
Kafeik Asit



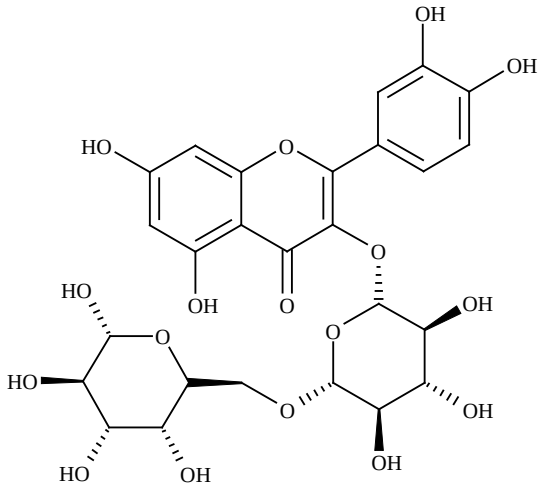
Gallik Asit



Klorojenik Asit



Kateşin



Rutin

Şekil 2.1. Dut Yaprağındaki fenolik ve flavonoidler

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Diyarbakır Hevsel Bahçelerinden toplanılan Kara Dut (*M. nigra*) Yaprakları materyal olarak kullanıldı. *M. nigra* yaprak liyofilizatları ile total fenolik-total flavonoid tayini, DPPH radikali ve hidroksi radikali söndürme aktiviteleri belirlendi. Literatür sonuçlarıyla desteklenen antioksidant parametrelerin ardından DNA çalışmaları yapıldı.

3.1.1. Kara Dut Yaprağı

Çalışmada kullanılan Kara dut (*Morus nigra*) yaprakları Mayıs 2017'de Diyarbakır'dan toplandı. Bitki materyalinin bir örneği Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Hasan Çetin Özen tarafından bilimsel olarak tanımlandı.

3.1.2. Kullanılan Aletler

UV-VIS Spektrofotometre (Varian marka, Cary 100 Bio model), Jel Görüntüleme Sistemi (Bio Rad Gel Doc XR marka), Elektroforez (Bio Rad mini protean marka), Santrifüj (Hettich marka, Universal 320 R model), Sterilizatör (Heraus marka),

Otoklav (Hiramaya marka), Terazi (Metler Toledo marka), Vortex (Heiidolph marka), pH –metre (Metler Toledo marka)

Soxhlet (Heiidolph marka, Laborota 4000 model), Evaporatör (Bibby Strilin Ltd marka, RE-100B model),

Derin dondurucu (Sanyo marka), Buzdolabı (Arçelik marka), Mikrodalga fırın (Arçelik marka), Çalkalayıcı (Memmert marka)

Mikropipet (Ependorf marka), Membran filtresi (Schleicher-Schvell marka), Blender, UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu, UV/Visible Recording spektrofotometre), Floresans Spektrofotometresi, Laminar air flow (Kendro-Hera KS12), vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), Çalkalayıcı orbital inkübatör (zehrincheng zhwy-200b) aletler ve cihazlar kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gallik asit, etanol,1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitolue (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), α-tokoferol, quercetin, folin&ciocalteu's fenol reaktifi, sodyum karbonat, demir-2-klorür, demir-3-klorür, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), hidrojen peroksit, ferrozin, ferrisiyanit, trikloroasetikasit (TCA), KH_2PO_4, K_2HPO_4 deoksiriboz, 2-tiyobarbitürik asit (TBA), sodyum hidroksit, pBr 322 plazmid DNA, askorbik asit, agaroz, tris base, comassie brillant blue R, aminoguanidin, D-fruktoz, metformin Aldrich ve Merck'den ticari olarak temin edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Kara Dut Yaprağı Etanol Ekstraktının Hazırlanışı

Toplanan yapraklar doğrudan güneş ışığı almayan ve iyi hava akışı olan bir ortamda, kurutuldu. Dut yaprakları blender yardımıyla toz haline getirildikten sonra 3 farklı ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edildi. Evaporatör yardımıyla etanol uzaklaştırıldı (Şekil 3.2.2.). Ardından liyofilizatör ile ekstraktlar içindeki kalan su uzaklaştırıldı (Şekil 3.2.1.).



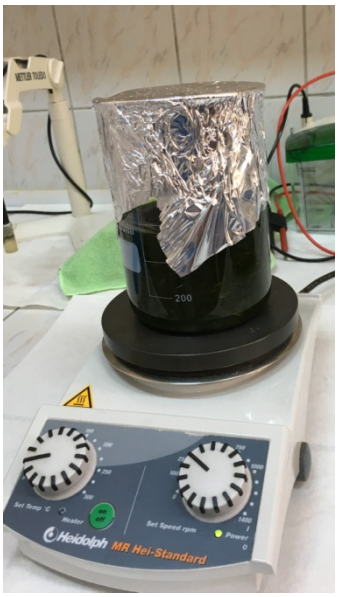
Şekil 3.2.1. Liyofilizasyon



Şekil 3.2.2. Evaporasyon

3.2.1.1. Maserasyon yöntemi ile ekstraksiyon

M. nigra yaprağı (20 g), çözücü olarak % 96'lık etanol (500 ml) kullanıldı. Bir beherde 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra vakum altında süzüldü. Süzüntü, oda sıcaklığında, vakum altında bir döner buharlaştırıcı içinde buharlaştırıldı. (Şekil 3.2.1.1). Ekstrakt koyu renkli şişede +4 ^{o}C sıcaklıkta kullanılıncaya kadar saklandı (Goci ve ark. 2013).



Şekil 3.2.1.1. Maserasyon yöntemi

3.2.1.2. Sokslet yöntemi ile ekstraksiyon

M. nigra yaprağı (20 g) sokslet ekstraktörünün kartuşunun içine yerleştirildikten sonra % 96'lık etanol çözücüsü (500 ml) ile 4 saat ekstraksiyon yapıldı. Ekstrakt oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Daha sonra, süzüntü oda sıcaklığında, vakum altında bir döner buharlaştırıcı içinde buharlaştırıldı (Şekil 3.2.1.2.). Ekstrakt koyu renkli şişede +4 ^{o}C sıcaklıkta kullanılıncaya kadar saklandı (Goci ve ark., 2013).



Şekil 3.2.1.2. Sokslet Yöntemi

3.2.1.3. Ultrasound yöntemi ile ekstraksiyon

M. nigra yaprağı (20 g), % 96'lık etanol (200 ml) içerisinde 50 ^{o}C'de 1 saat sonike edildi. Sonikasyon yirmişer dakikalık üç seansta gerçekleştirildi ve her bir seans arası 30 dakika beklendi. Çözücü vakum altında süzüldükten sonra, oda sıcaklığında, vakum altında bir döner buharlaştırıcı içinde buharlaştırılarak ekstrakt elde edildi (Şekil 3.2.1.3.). Ekstrakt koyu renkli şişede +4 ^{o}C sıcaklıkta kullanılıncaya kadar saklandı (Goci ve ark. 2013).



Şekil 3.2.1.3. Ultrasound Yöntemi

Bu yöntemler sonucunda elde edilen ekstraktların toplam fenolik, flavonoid, DPPH radikalini söndürme aktiviteleri araştırıldı. Total fenolik, total flavonid ve DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin her birinde sokslet yöntemi ile elde edilen ekstrakt daha iyi aktivite gösterdiği tespit edildi. Sokslet yöntemiyle ekstraksiyondan elde edilmiş olan ekstrakt ile OH radikalini söndürme aktivitesi, DNA Glikasyonu, DNA Oksidasyonu, Fruktozamin testi, UV ve Floresans araştırmaları yapıldı.

3.2.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayin

M. nigra yaprak ekstraktı içindeki toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre tayin edildi ve standart olarak gallik asit kullanıldı. Bu yöntem ile gallik asit içindeki fenolik bileşen miktarını gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktı içindeki total fenolik bileşen miktarını gallik asidin eşdeğer miktarına göre hesaplandı (Silinkard ve ark. 1997).

Absorbans (A) = 0,00095 x Gallik asit (µg) (R^2: 0,99)

3.2.3. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

M. nigra yaprak ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktar tayini (Zhishen ve ark. 1999) tarafından tanımlanan yöntem ile tayin edildi. Standart olarak quersetin kullanıldı. Bu yöntem ile kuersetin içindeki flavonoid bileşen miktarını quersetinin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktının içindeki toplam flavonoid bileşen miktarını kuersetine eşdeğer olarak hesaplandı.

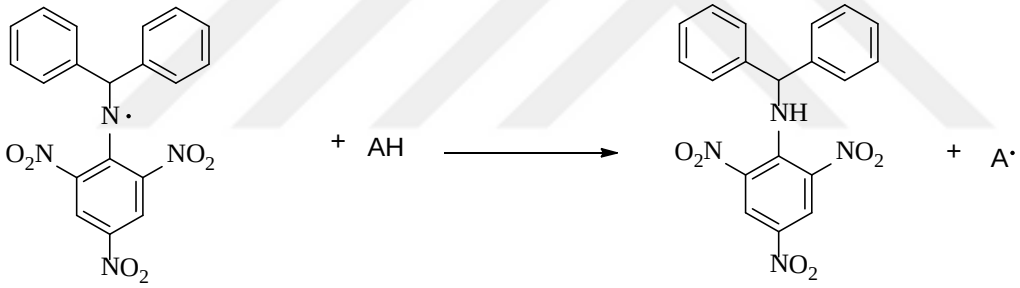
Absorbans (A) = 0,00527 x Kuersetin (µg) (R^2: 0,99)

3.2.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidantlar DPPH radikalini söndürebilmek için hidrojenlerini radikale verirler. DPPH radikali serbest ve kararlıdır. Elektron veya hidrojen alarak kararlı olurlar. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkanı sağladığından daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Gülçin ve ark. 2004). Bu metodun temel prensibi absorbansın azalmasına dayanır.

DPPH üzerindeki ortaklanmamış elektronlar görünür bölgede 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına böylece absorbansın azalmasına neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H 'dır (Şekil 3.2.4.).

Reaksiyon esnasında karışımının rengi mordan sarıya döner.



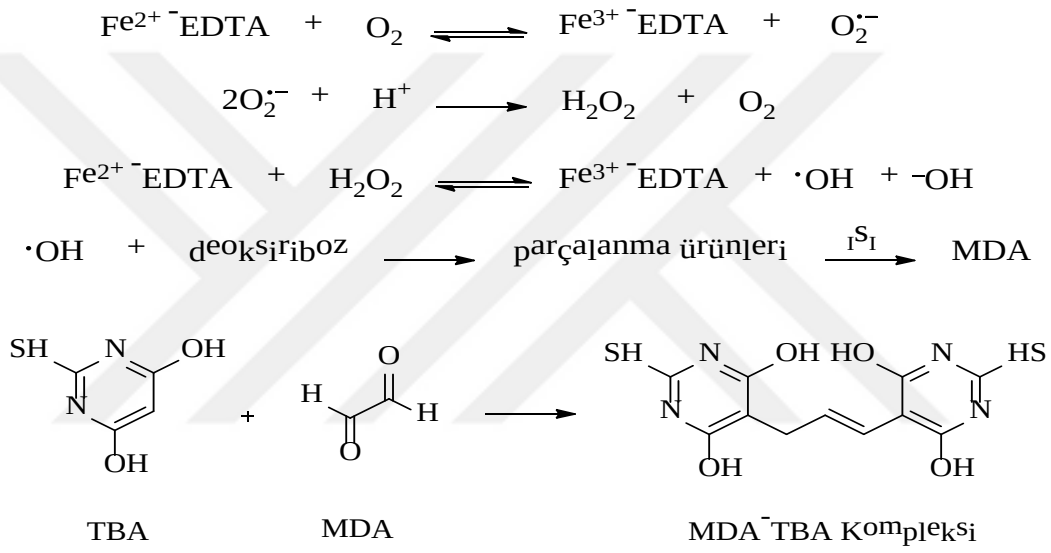
Şekil 3.2.4. DPPH Radikalinin İndirgenmesi

Çalışmada kullanılan *M. nigra* yaprak ekstraktlarının 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 10-500 µg/ml konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. %96'lık etanol içinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. Seyreltilen bitki ekstraktından 3 ml alınarak üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 517 nm'de UV cihazında absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT ve kullanıldı. Negatif kontrol bitki örneği veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

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

3.2.5. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Çalışmada kullanılan *M. nigra* yaprak ekstraktının deoksiriboz metoduyla Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Hidroksi radikali deoksiriboza atak yaptıktan sonra malondialdehiti (MDA) oluşur. Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Wang ve ark. 2003).



Şekil 3.2. Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu

Sırasıyla; 100µl 1mM EDTA, 10 µl 0,1 mM $FeCl_3$, 100µl 50 mM H_2O_2, 360 µl 2,8 mM deoksiriboz, 1 ml *M. nigra* yaprak ekstraktı (50-500 µg/ml), 330 µl 50 mM pH 7,4 fosfat tampon ve 100 µl 0,3 mM askorbik asit kullanıldı. Karışım karanlıkta ve 37 ^oC'deki su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından karışımlardan 1'er ml alınarak üzerine sırasıyla; 1 ml % 10'luk TCA ve 1 ml % 0,5'lik TBA (0,025M NaOH içinde % 0,025 BHA içerir) ilave edildi. 100 ^oC su banyosunda de pembemsi renk sarıya dönene kadar (yaklaşık 5 dk) kaynatıldı. Renk dönüşümü gözlendiği anda buzda soğutuldu. 532 nm ' de UV spektroskopide absorbansa değeri ölçüldü (Mazumder ve ark. 2005).

Negatif kontrolde bitki ekstraktı ve pozitif kontrol yoktur. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

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

3.2.6. *İn Vitro* DNA'nın hasarı: (DNA'nın fruktozilasyonu)

DNA, 10, 20, 30, 40, 50 mM fruktoz, *M. nigra* yaprak ekstraktı ve etken maddesi kuersetin ile farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) 37 ºC' de 10 gün inkübasyona bırakıldı. 10. Gün sonda kontrol DNA jel görüntüleme sisteminde lineer formda (Form III) gözlendiği için inkübasyon süresi yarıya indirildi. 5. Gün sonunda DNA hasarı oluşturuldu (Zaman ve ark. 2016)

3.2.7. Diyaliz İle DNA' ya Bağlanmamış Şekerleri Uzaklaştırmak

Çalışmanın prensibi yarı geçirgen bir zar yardımıyla çok yoğun ortamdan az yoğun ortama madde geçişi sağlamak temeline dayanır. Bu yöntem kullanılarak DNA' ya bağlanmamış şekerler uzaklaştırıldı (Şekil 3.2.7.).

Fosfat tamponunda (pH 7.4) yumuşatılan diyaliz zarları ip ile bağlandı. Örnekler diyaliz tüplerine pipet yardımıyla aktarıldı. Fosfat tamponu içine bırakıldı ve 8 saatte bir tamponları değiştirildi. 24 saat sonra işlem durduruldu.



Şekil 3.2.7. Diyaliz

Sonraki adımlarda sırasıyla doğal ve hasarlı DNA' da ;

3.2.8. Fruktozamin Testi (DNA' da Amadori ürünlerinin Tayini)

Nitroblue tetrazolyum testi ile diyalizlenmiş DNA örneklerinde Amadori Ürünlerinin oluşturacağı değişiklikler tespit edildi. DNA örneği (25 µg/ml) 100 mM sodyum karbonat tamponu ve (pH 10.8) 0.25 mM NBT içeren çözelti ile 37 °C'de 5 saat inkübe edildi. Amadori ürünleri NBT'yi indirgeyerek NBT^{+} radikalini oluşturdu ve mor renk gözlemlendi. Daha sonra 525 nm'de absorbsiyon değerleri okundu (Wani ve ark. 2012).

3.2.9. UV-Visible Absorbans Spektroskopisi (200-400 nm)

UV-1700 Spektrofotometre üzerinde kuvartz küveti kullanılarak 1 cm uzunluğundaki yolda ve 200-400 nm dalga boyu aralığında doğal DNA-fruktoz sisteminde DNA'nın absorbsiyon edildiği dalga boyu aralığına bakıldı. 260nm'de hiperkromisite hesaplandı (Wani ve ark. 2102).

$$\%\text{Hiperkromisite} = [\ (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}\ ] \times 100$$

3.2.10. Floresans Spektroskopisi (360-500nm)

Doğal ve glikole olmuş DNA'nın spektrum analizi spektrofotometre kullanılarak yapıldı. Uyarıldıkları dalga boyunda floresans yoğunlukları hesaplandı(Wani ve ark. 2012). Absorbans değerleri ile %AGE iinhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\%F = [\ (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}\ ] \times 100$$

3.2.11. DNA Oksidasyonu

Hidrojen peroksitin UV ile fotolizi sonucu oluşan OH radikalinin DNA üzerine oksidasyon etkisi pBR 322 plazmid DNA kullanılarak Agaroz Jel Elektroforezinde incelendi (Pietta 2000). *Morus nigra* yaprak ekstraktları ve kuersetin 50- 250 µg/ml konsantrasyon aralığında DNA'yı hidroksi radikaline karşı koruma etkisine bakıldı.

3.2.12. Agaroz Jel Elektroforezi (Alkalin ve non-Alkalin)

DNA-fruktoz sisteminde *M. nigra* yaprak ekstraktı ve kuersetinin etkisi incelendi. Numunelerin alkali ve non-alkali koşullarda elektroforetik göç modeli gözlemlendi. Alkalin jel elektroforez tamponu (50 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 8.0)

eklenerek hazırlandı. Numuneler etanol ile çökeltilecek ve alkalin yükleme tamponu hazırlandı (50 mM NaOH, 1 mM EDTA,% 5-10 gliserol,% 0.025 bromofenol mavi). Değişik derişimlerde hazırlanacak numuneler jel kuyularına yüklendi ve 30 V/cm'de 14 saat boyunca elektroforezlendi. Jel, etidyum bromid (0.5 mg / ml) ile lekelendi, UV ışık altında aydınlatılarak incelendi ve fotoğraflandı.

Doğal DNA ve DNA-fruktoz, DNA-fruktoz-bitki sistemi alkali koşullar altında % 0.8 agaroz jel üzerinde, 30 mA'de 2 saat boyunca elektroforezlenen TAE tamponu (40 mM Tris-asetat, 2 mM EDTA, pH 8.0) gözlemlendi. Bantlar, etidyum bromid (0.5 mg / ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görselleştir

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *M. nigra* Yaprak Ekstraktının % Verimi

Çalışmada kullanılan *M. nigra* yapraklarının %96' lık etanol-su çözeltileri ile hazırlanan ekstraktları için% verim hesaplandı (Tablo 4.1.).

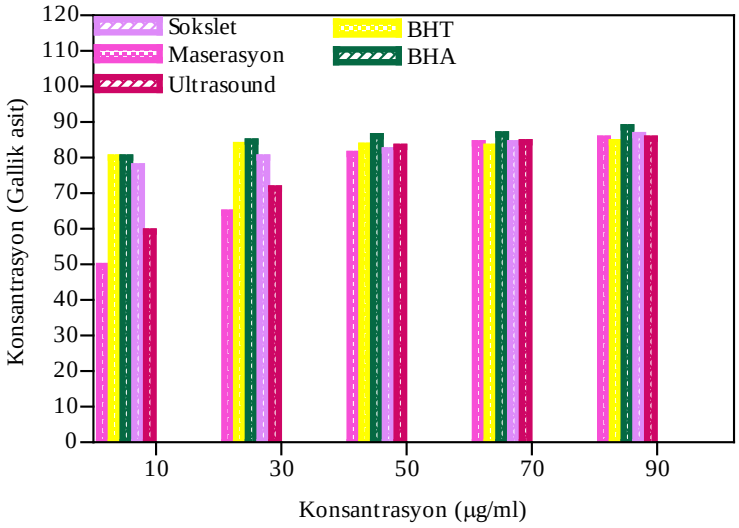
Çizelge 4.1. Kara dut yaprağı etanol ekstraktı (*M. nigra*) % verim

Yöntemler	Alınan Bitki Miktarı (g)	Kullanılan Çözücü Miktarı (ml)	Elde Edilen Ekstrakt Miktarı (g)	% Verim
Maserasyon	20	500	8.52	42.6
Sokslet	20	500	8.58	42.9
Ultrasaund	20	200	9.39	46.95

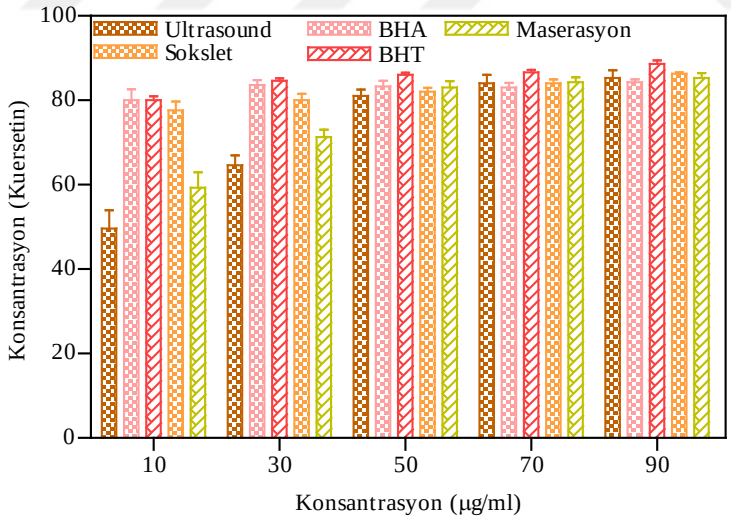
4.2. Total Fenolik ve Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

Çizelge 4.2. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı içindeki toplam fenolik ve flavonoid bileşen miktar tayini. Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

Örnek	Fenolik Bileşen (µg Gallik asit (GAE)/mg ekstrakt)	Flavonoid Bileşen(µg Kuersetin (QUE)/mg ekstrakt)
Maserasyon	64,4±0.003	138,62±0.06
Sokslet	76,3±0.003	143.94±0.06
Ultrasound	54,8±0.003	105,33±0.06

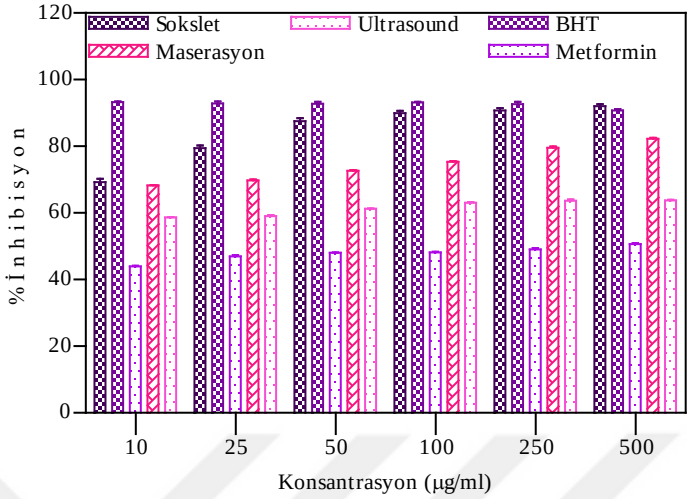


Şekil 4.2.1. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı içindeki gallik aside eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları (10, 30, 50, 70, 90 µg/ml). Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)



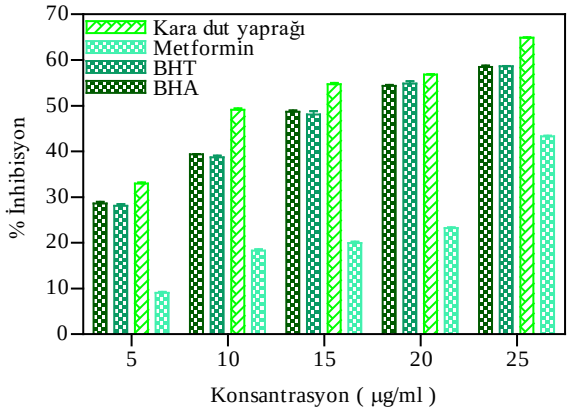
Şekil 4.2.2. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı kuersetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarları(10, 30, 50, 70, 90 µg/ml). Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

4.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi



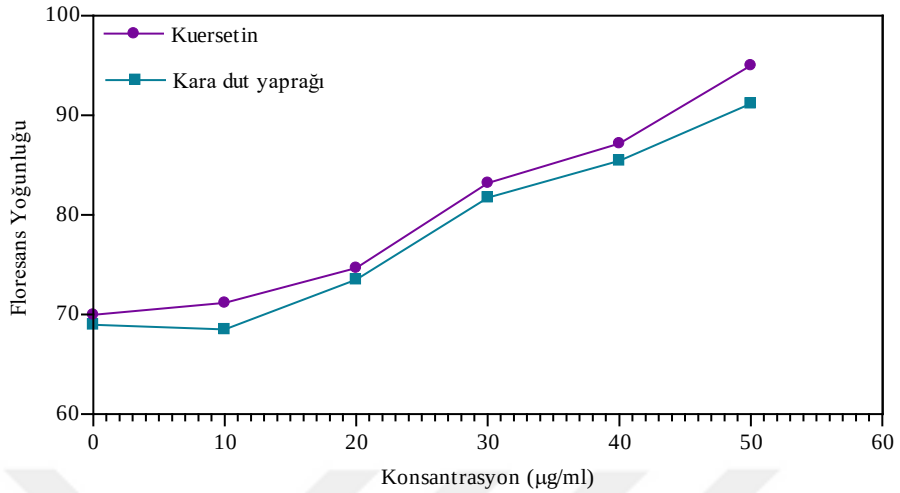
Şekil 4.3. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının 1,1- difenil-2-piril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi. Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

4.4. OH Radikalini Söndürme Aktivitesi

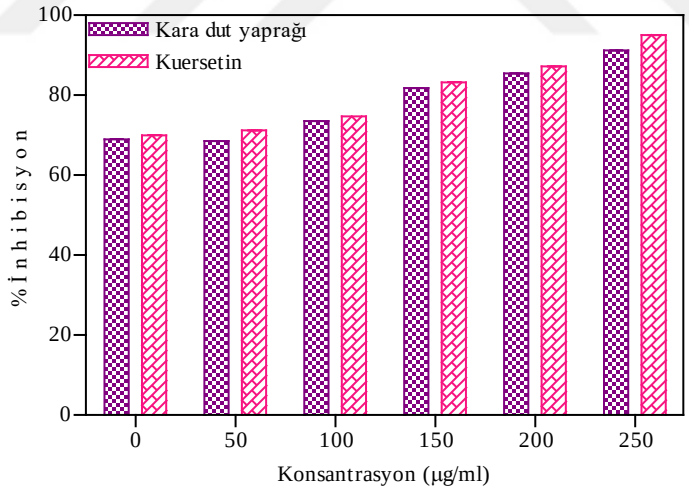


Şekil 4.4. *M. nigra yaprağı* etanol ekstraktının (sokslet) farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25 µg/ml) TBA metodu ile Fe^{+2}/ askorbat / EDTA / H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%). Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

4.5. Floresans Spektroskopisi (360-500nm)

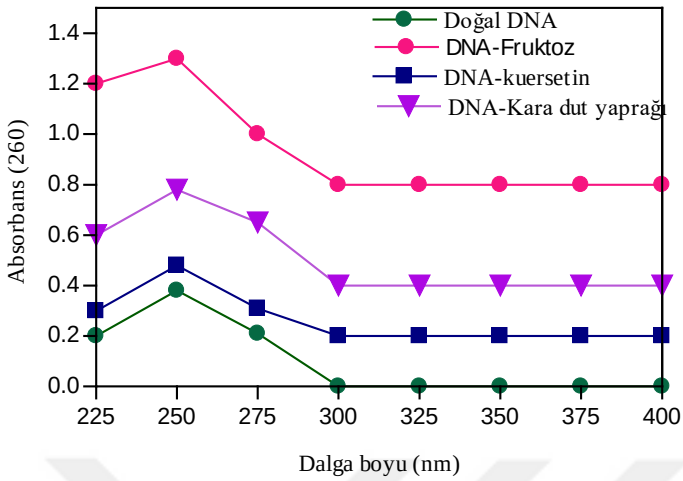


Şekil 4.5.1. DNA-Fruktoz-*M. nigra* , DNA-Fruktoz-kuersetin sistemindeki (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) konsantrasyonlarında total floresans yoğunluğu. Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

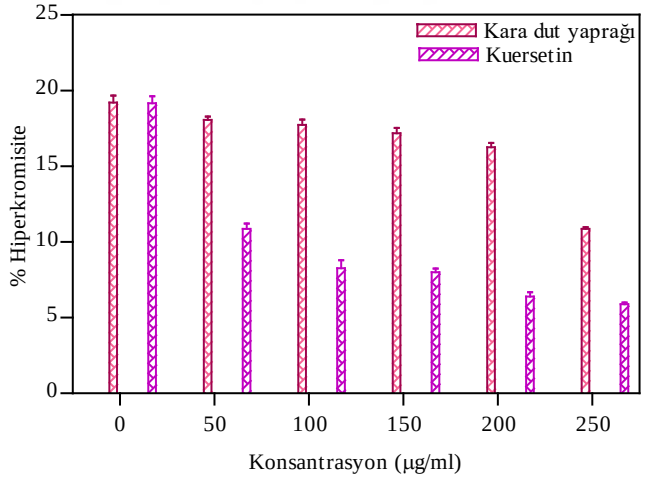


Şekil 4.5.2 .DNA-Fruktoz, sisteminde (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) konsantrasyonlarındaki *M. nigra* yaprağı ve kuersetinin % inhibisyonu. Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

4.6. UV-Visible Absorbans Spektroskopisi (200-400 nm)

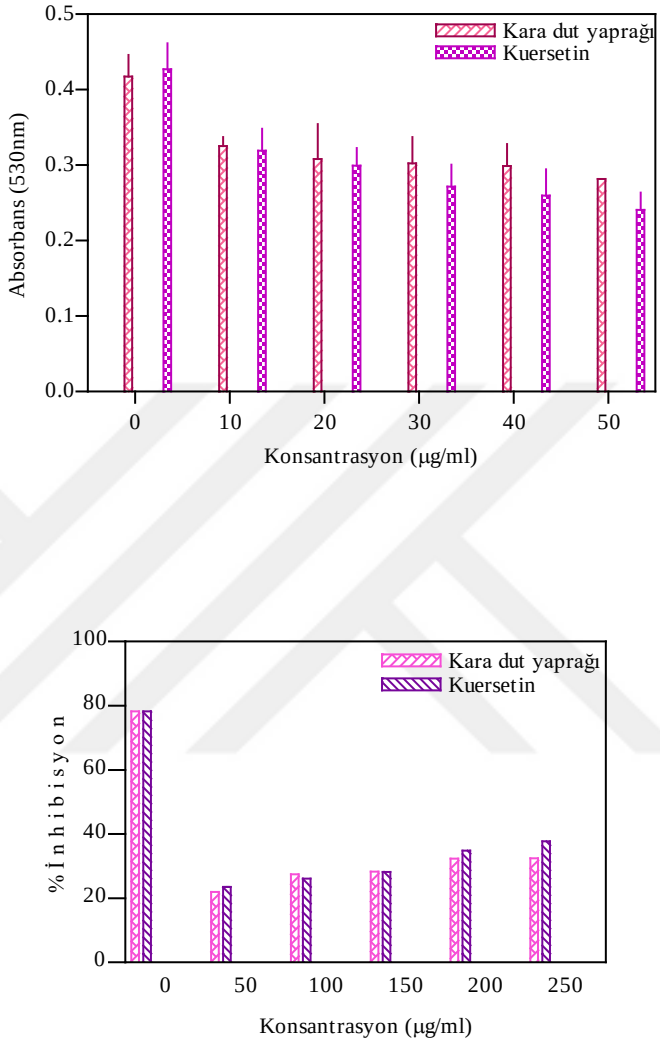


Şekil 4.6.1. *M. nigra* yaprağı ve etken maddesi kuersetinin (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) konsantrasyonlarında absorbsiyon ettiği dalga boyu aralıkları (260 nm). Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)



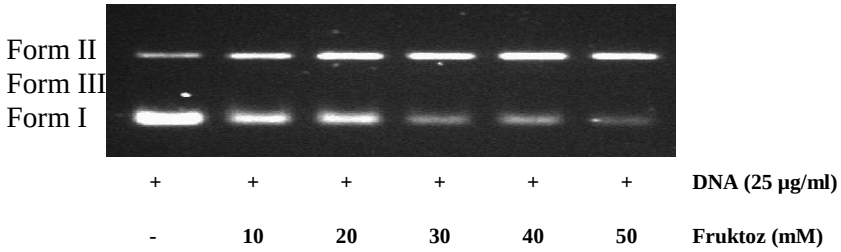
Şekil 4.6.2. DNA-Fruktoz, DNA-Fruktoz-*M. nigra* , DNA-Fruktoz-kuersetin sistemindeki UV spektroskopi çalışmasında % Hiperkromisite değerleri. Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=3)

4.7. Fruktozamin Testi (DNA' da Amadori ürünlerinin Tayini)

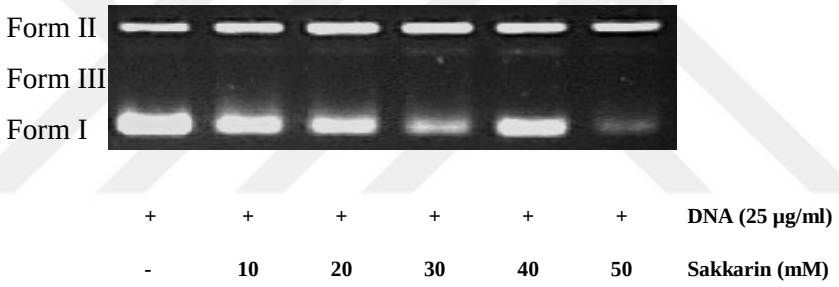


Şekil 4.7. DNA-Fruktoz sisteminde oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi ve fruktoz amin oluşumunun *M. nigra* etanol ekstraktı ve kuersetin ile inhibisyonları(% İnhibisyon değerleri). Her değer 3 deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) verilmiştir (n=

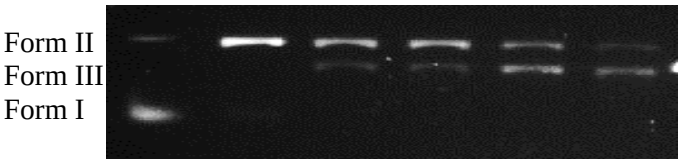
4.8. Agaroz Jel Elektroforezi



Şekil 4.8.1. DNA'nın artan konsantrasyonlardaki fruktoz ile glikasyonu (Form I'den Form II'ye) Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.

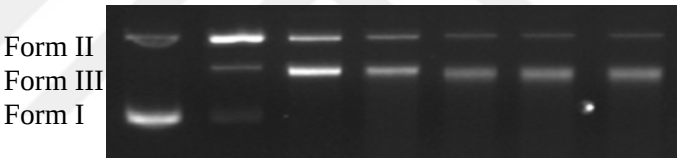


Şekil 4.8.2. DNA'nın artan konsantrasyonlardaki sakkarin ile glikasyonu (Form I'den Form II'ye) Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.



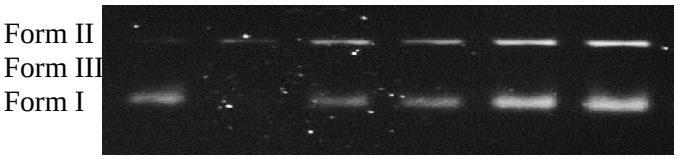
+	+	+	+	+	+	**DNA (25 µg/ml)**
-	+	+	+	+	+	**Fruktoz (50 mM)**
-	-	**50**	**100**	**250**	**500**	***M. nigra* (mg/ml)**

Şekil 4.9.1. *M. nigra* etanol ekstraktının artan konsantrasyonlarında, DNA fruktozilasyonu üzerine etkisi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.



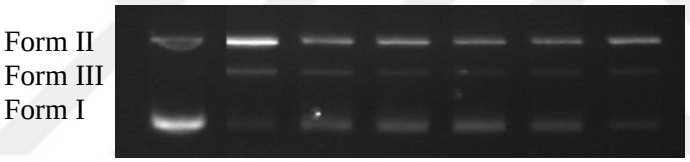
+	+	+	+	+	+	+	**DNA (25mg/ml)**
-	+	+	+	+	+	+	**Fruktoz (50 mM)**
-	-	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	***M. nigra* (mg/ml)**

Şekil 4.9.2. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının artan konsantrasyonlarının DNA fruktozilasyonuna etkisi (diyaliz sonrası) Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.



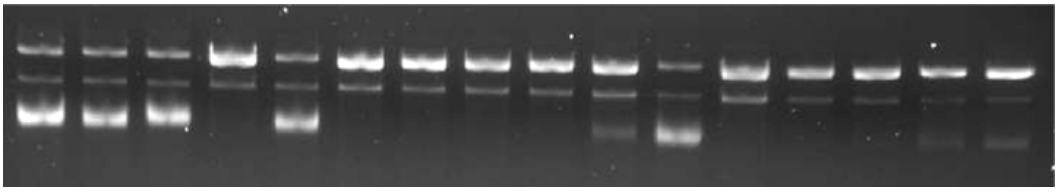
+	+	+	+	+	+	**DNA (25 µg/ml)**
-	+	+	+	+	+	**Fruktoz (50 mM)**
-	-	**50**	**100**	**250**	**500**	**Kuercetin (mg/ml)**

Şekil 4.10.1. Kuersetinin artan konsantrasyonlarının DNA fruktozilasyon üzerine etkisi (Form II'den Form I'e) Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.



+	+	+	+	+	+	+	**DNA (25 µg/ml)**
-	+	+	+	+	+	+	**Fruktoz (50 mM)**
-	-	**50**	**100**	**150**	**200**	**250**	**Kuercetin (mg/ml)**

Şekil 4.10.2. Kuersetinin artan konsantrasyonlarının DNA fruktozilasyon üzerine etkisi (diyaliz sonrası)Form III'ten Form I'e Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.



+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DNA (µg/ml)
-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	H_2O_2
-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	UV
-	-	-	+	100	50	100	150	200	250	-	-	-	-	-	-	*M. nigra* (mg/ml)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	50	100	150	200	250	Kuersetin (mg/ml)

Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının ve quercetinin supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/ml) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

AGE'ler; protein ve lipid gruplarını modifiye eder. Glikasyon esnasında oluşan reaktif oksijen türleri ileri glikasyon son ürünleri aracılığıyla antioksidan sistemi bozar. Böylece oksidatif-kronik stres; başta diyabet ve kanser olmak üzere çoğu hastalığa neden olur.

DNA'nın şeker ile reaksiyona girmesi DNA-AGE oluşumu ile sonuçlanır. Glikasyon DNA'ya önemli derecede hasar verir. DNA' nın depürinasyonu, iplikçik kopması, ekleme ve silme gibi mutasyonlara neden olur. Bu nedenle DNA-AGE' leri; yaşlanma sırasında oluşan genomik bütünlüğün kaybedilmesi, kansere ve başka hastalıklara neden olabilir (Bucala R. ve ark. 2012).

Glikasyon ürünleri; artan diyabet, obezite, kanser, nörolojik hastalıklar ve kalp damar hastalıkları gibi birçok hastalığın en önemli nedenlerden biridir. Dünyada özellikle Amerika Birleşik Devletlerinde yaygın olan fruktoz (mısır) şurubu kullanımı AGE komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Vücudun ürettiği antioksidan savunma elemanları; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Bazı enzimlerin aktif olabilmesi için yapılarında metal iyonlarının bulunması gerekmektedir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'da ise selenyum bulunur (Halliwell B. 1991).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yüksek biyoaktif içeriği nedeni ile *Morus nigra*'nın (Kara dut) diğer dut türlerine kıyasla doğal antioksidan özelliklere sahip biyo-flavonoidleri ve antosiyaninleri içerdiği tespit edilmiştir. Dut yaprağının farmakolojik özelliklerinden bu biyoaktif moleküllerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Ashraf ve ark. 2012).

Bu çalışma ile;

- 3 farklı yöntem ile Kara dut (*M. nigra)* yapraklarının etanol ekstraktları elde edildi (Tablo 4.1.).
- Total fenolik, total flavonoid ve DPPH yöntemleri kullanılarak en iyi antioksidant aktiviteyi gösteren ekstrakt belirlendi (Tablo 4.2.) ve (Şekil 4.3.).
- OH radikali söndürme aktivitesi araştırıldı (Şekil 4.4.).

- Nişasta bazlı şekerlerden fruktozun, DNA hasarına neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.8.).
- En yüksek aktiviteyi gösteren *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı ve ana etken maddelerinden biri olan kuersetinin DNA hasarı üzerine etkisi, elektroforez, UV ve floresans araştırmaları sonucunda belirlendi.

5.1. Antioksidant Çalışmalar

5.1.1. Total Fenolik ve Flavonoid Miktarları

Fenolik maddeler radikal söndürücü doğal antioksidantlardır. Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve radikal söndürücü olduğu bilinmektedir (Pietta, 2000).

Çalışmada kullanılan *M. nigra* yaprağı etanol-su ekstraktlarının içerdiği fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Toplam flavonoid bileşen miktar tayini kuersetine eşdeğer olarak hesaplandı (Tablo 4.2.).

Total fenolik bileşen miktarı 10-90 µg/ml aralığında 5 konsantrasyon çalışıldı. *M.nigra* yaprağı etanol ekstraktlarının 1mg'ının içerdiği fenolik bileşenleri; sokslet yönteminde 76,3±0.003µg GAE, maserasyon yönteminde 64,4±0.003 µg GAE, ultrasound yönteminde 54,8±0.003 µg GAE eşdeğer olarak hesaplandı (Şekil 4.2.1.).

Total flavonoid bileşen miktarı 50-250 µg/ml aralığında 5 konsantrasyon çalışıldı. *M.nigra* yaprağı etanol ekstraktının 1 mg'ının içerdiği flavonoid miktarı ise; sokslet yönteminde 143.94±0.06 µg QUE, maserasyon yönteminde 138,62±0.06 µg QUE, ultrasound yönteminde 105,33±0.06 µg QUE eşdeğer olarak hesaplandı (Şekil 4.2.2.).

M. nigra yaprağı etanol ekstraktındaki total fenolik ve flavonoid bileşen miktarları; sokslet > maserasyon > ultrasound olarak belirlendi.

Ercisli ve ark. (2010) kara dut meyvesindeki fenolik bileşen miktarını gallik aside ekivalent olarak (1422 mg/g) (Gallik asit) GAE/g hesapladılar.

Ercisli ve ark. (2010) kara dut meyvesindeki flavanoid bileşen miktarını kuersetine ekivalent olarak (276 mg/g) (Kuersetin) QUE/g olarak belirlediler.

M. nigra yaprağı meyvesi ile karşılaştırıldığında; fenolik bileşen miktarı yaklaşık 1/20'si kadar flavonoid bileşen miktarı yaklaşık ½'si kadar olduğu tespit edildi.

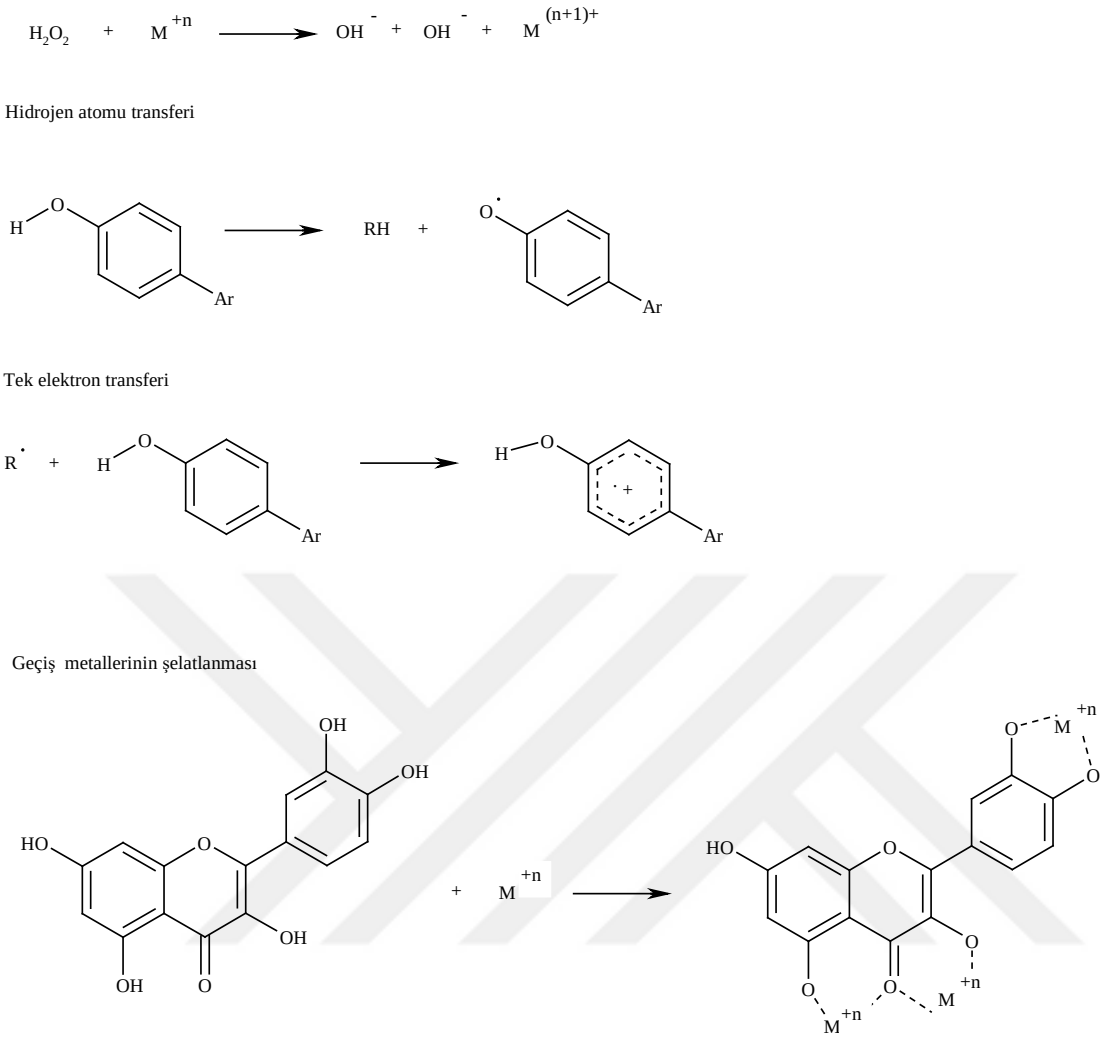
Antioksidant maddelerin bulundurduğu polifenolik bileşikler; ışık, iklim, çözücü gibi bazı dış fiziksel etmenlerden etkilenirler (Heimler ve ark. 2007).

Fenollerin antioksitant etkileri 3 mekanizma ile açıklanmıştır (Leopoldini ve ark. 2004).

1. mekanizmada (HAT-hidrojen atom transferi) polifenoller (ArOH) serbest radikale ($R^{\cdot}$); hidrojen vererek etkisisz hale getirir.

2. mekanizmada (SET-single electron transferi) (ArOH) serbest radikale ($R^{\cdot}$);eletron vererek daha zararsız $ArOH^{\cdot+}$ radikalini oluşturur .

3. mekanizmada (TMC-geçiş metallerin şelatlanması) serbest radikal oluşumuna katılan geçiş metalleri; polifenoller ile şelatlanarak kararlı bileşikler meydan getirir. H_2O_2 ile metal iyonu arasındaki fenton reaksiyonu sonucu oluşan $^{\cdot}OH$ radikalinin oluşumu engellenir (Monica ve ark. 2011) (Şekil 5.1.1.).



Şekil 5.1.1. Polifenollerin antioksidant mekanizması

5.1.2. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidant maddeler kendi hidrojenlerini radikale vererek DPPH radikalini söndürürler DPPH serbest ve kararlı bir radikaldir. DPPH radikalini söndürme etkisi diğer antioksidant metotlara gore kısa zamanda belirlenir. Bu nedenle daha yaygın kullanılmaktadır (Gülçin ve ark. 2004).

DPPH radikalini söndürme aktivitesi belirlenirken *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktları 10-500 µg/ml aralığında 6 konsantrasyon çalışıldı. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktları; % 69.45 ile % 91.88 aralığında söndürme aktivitesi gösterdi.

Maksimum aktiviteyi sokslet yönteminde % 91,88 inhibisyon, maserasyon yönteminde % 82,26 inhibisyon, ultrasound yönteminde % 63,71 inhibisyon, pozitif kontrol olan BHT ise % 94,26 inhibisyon gösterdi (Şekil 4.3.).

En yüksek aktiviteyi sokslet yöntemiyle elde edilen *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının gösterdiği tespit edildi.

Bitki ekstraktlarının serbest radikalleri söndürmesi bu ekstraktların içindeki fenolik bileşenlerin serbest radikaleri daha kararlı ürünlere dönüştürmesinden kaynaklanmaktadır. DPPH ve fenoller arasında (HAT) ve (SET) reaksiyonları olduğu kabul edilir (Musialik ve Litwinienko 2005).

5.1.3 Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi

Deoksiriboz metoduyla Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Hidroksi radikali deoksiriboza atak yaptıktan sonra sıralı reaksiyonlar sonucunda MDA (malondialdehit) oluştu. Oluşan MDA, TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini oluşturdu. MDA, DNA ile çapraz bağlanma yapabilir (Şekil 3.3.).

Sokslet yöntemiyle elde edilen *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının OH radikalini söndürme aktivitesi 5-25 µg/ml aralığında 5 konsantrasyon çalışıldı.

% inhibisyonları; $\% I = [(A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100$ formülü ile hesaplandı.

Pozitif kontrol olarak BHA ve BHT kullanıldı. Ayrıca; antidiyabetik olduğu bilinen ve çeşitli tedavilerde kullanılan metforminin de hidroksi radikalini söndürme aktivitesine bakıldı. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı; % 33,33 ile % 64,97 aralığında hidroksi radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. BHA; % 28,24 ile % 58,38 aralığında BHT ise; % 59,13 ile % 72,31 aralığında inhibisyon etkisi gösterdi. Metforminin; % 9,03 ile % 43,31 aralığında inhibisyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.4.).

Metforminin biguanid grubu bir antidiyabetik olduğu bilinmektedir. Metforminin diyabette kardiyovaskuler mortalite oranını azalttığı belirtilmektedir. Bu da muhtemelen metforminin andidiyabetik özelliklerinin yanında başka mekanizmalarında rol oynadığını göstermektedir. Metforminin örneğin eritrosit, karaciğer ve kan glutatyonunu artırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı

belirtilmektedir. Aynı zamanda demir ve bakır gibi metallerle şelat yaparak onların toksik etkilerini yok ettiği için de antioksidan özellik gösterir (Yılmaz ve ark. 2005).

Sonuç olarak; *M.nigra* yaprağı etanol ekstraktının pozitif kontrol BHA'dan daha yüksek aktivite gösterdiği, BHT ile neredeyse aynı inhibisyonu gösterdiği tespit edildi. Metforminin de hidroksi radikalini söndürme aktivitesinin olduğu tespit edildi.

5.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jelde DNA üç formda bulunur; super kıvrımlı form (Form I), tek zincir kırıklı çembersel form (Form II), lineer form (Form III). Bu formlar jelde farklı hızla hareket ederler. Form I' in yük yoğunluğu çok hacmi küçük olduğundan jelde hızlı hareket eder. Form II^nin yük yoğunluğu daha az olduğundan daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II arasında hıza sahiptir (Pietta 2000).

5.2.1. DNA'nın Fruktozilasyonu

DNA-fruktoz sistemi ve DNA oksidasyonu ayrıca DNA-sakkarin sisteminde tatlandırıcının DNA üzerindeki etkisi agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

25µg/ml pBR 322 plazmid DNA; 10, 20, 30, 40, 50 mM fruktoz ile 37 ºC' de 5 gün inkübasyona bırakıldı. 5. günün sonunda fruktozun konsantrasyonu arttıkça Form I'in kaybolduğu Form II'nin ve Form III'ün oluştuğu gözlendi (Şekil 4.8.).

Fruktoz non-enzimatik olarak biyolojik makromaoleküllerden DNA'da iplikçik kopması, depürinasyon gibi mutasyonlara sebep olabilir (Wani A.ve ark. 2012).

Artan konsantrasyonlardaki fruktoz ve sakkarinin, DNA'da kırıklara sebep olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8.1) (Şekil 4.8.2)

5.2.2. *M. nigra* Yaprağı Etanol Ekstraktının ve Kuersetinin DNA-Fruktoz Sistemindeki Etkisi

50 mM fruktoz ile 25µg/ml pBR 322 plazmid DNA sisteminde; 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarındaki *M. nigra* yaprağının sokslet yöntemi ile elde edilmiş etanol ekstraktı ve kuersetin kullanıldı.

DNA, Form II ve daha çok Form III olarak gözlemlendi. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının artan konsantrasyonda DNA'nın çembersel formunu bozarak lineer forma dönüştürdüğü tespit edildi (Şekil 4.9.1.) (Şekil 4.9.2.).

Kuersetinin ise artan konsantrasyonlarda DNA'nın super kıvrımlı formunu geri kazandırdığı gözlemlendi (Şekil 4.10.1.) (Şekil 4.10.2.)

Sağlıklı kişilerde serbest radikal/antioksidant dengede bulunur (Bakan E. ve ark. 2004). ROT; AGE oluşumunu arttıran etmenlerden bir tanesidir. Antioksidant maddeler serbest radikalleri söndürür (Şekil 5.1.1.). Böylece AGE oluşumu bir yolakta önlenmiş olur.

Ya da antioksidant aktiviteleri çok iyi bilinmesine rağmen eksojen antioksidantlar yüksek dozlarda ve özellikle bakır, demir gibi metal iyonları varlığında pro-oksidant aktivite gösterirler (Robaszkiewicz ve ark. 2007) yaptıkları çalışmaya gore; kuersetin, kateşin, ve gallik asit gibi antioksidantlara sahip polifenolik bileşikler pro-oksidatif etki gösterebilirler. Pro-oksidant aktivite maddenin molekül yapısı ve konsantrasyonuna bağlıdır. *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının DNA kırıklarını arttırması pro-oksidatif hasarı gösterebilecek nitelikte olabilir (Robaszkiewicz ve ark. 2007). (Şekil 4.9.1.) (Şekil 4.9.2.).

5.2.3. Diyaliz

50 mM fruktoz ile 25µg/ml pBR 322 plazmid DNA sisteminde; 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarındaki *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktları ve kuersetin kullanıldı. Amaç DNA'ya bağlanmayan şekerleri çok yoğun ortamdan az yoğun ortama doğru madde geçişi prensipiyle; diyaliz tüpünün içindeki serbest haldeki şekerleri tampona transfer etmekti. Diyaliz işlemi fosfat tampon içerisinde (pH 7,4) gerçekleşti. Örnekler diyaliz tüplerinin içerisinde 24 saat +4 ^{o}C 'de inkübasyona bırakıldı. 8 saatte bir tamponları değiştirildi. İnkübasyonun ardından örnekler elektroforezde görüntülendi. DNA'ya bağlanmayan şekerler, DNA örneklerinin jelde kolay ilerlemesine engel olabileceği jel görüntüleme sisteminde gözlemlendi (Şekil 4.9.2.) (Şekil 4.10.2.).

5.2.4. OH Radikali Kaynaklı DNA Kesimine *M. nigra* Yaprağı Etanol Ekstraktı ve Etken Maddesi Kuersetinin Etkisi

Hidrojen peroksitin UV ile fotolizi sonucunda oluşan OH radikalinin DNA üzerine oksidasyon etkisi pBR 322 plazmid DNA kullanılarak Agaroz Jel Elektroforezinde incelendi (Pietta 2000)

H_2O_2'in UV ile fotolizi sonucu DNA'nın super kıvrımlı formunun tamamının lineer ve tek zincir kırıklı forma dönüştüğü tespit edildi. *M.nigra* yaprağı etanol ekstraktının (sokslet) ve kuersetinin 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarındaki DNA kesimi üzerine etkisi gözlemlendi.

M. nigra yaprağı etanol ekstraktının 250 µg/ml konsantrasyonda DNA'nın lineer formdan super kıvrımlı forma dönüştüğü jel görüntüleme sisteminde gözlemlendi. Kuersetinin tüm konsantrasyonlarında DNA'nın lineer formunun kaybolduğu tek zincir kırığı ve super kıvrımlı formuna dönüştüğü gözlemlendi. (Şekil 4.11.).

Kuersetinin antioksidant madde olarak OH radikalini inhibe ettiği ve DNA'ya süper kıvrımlı formunu geri kazandırdığı, *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktının yüksek konsantrasyonda lineer formdan super kıvrımlı forma dönüştürdüğü tespit edildi.

5.3. Total AGE Floresans Yoğunluğu

DNA Glikasyonu saatler içinde Schiff bazı oluşumu ile başlar. Ardından günler içinde Amadori ürünlerine dönüşür. Amadori ürünleri dikarbonil ürünlerine ve haftalar aylar sonunda AGE'ine dönüşür.

DNA-fruktoz sisteminde; *M. nigra* yaprağının sokslet yöntemiyle elde edilmiş etanol ekstraktı ve kuersetinin artan konsantrasyondaki örnekleri; 37 ^{o}C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. *M. nigra* yaprağı ve kuersetinin AGE oluşumu üzerine etkisi; örneklerin 360 nm'de uyarılma ve 500 nm'de yayılma floresansları ölçülerek uyarıldıkları dalga boylarındaki floresans yoğunlukları hesaplanarak tespit edildi.

$$\%F = [\ (A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}\ ] \times 100$$

50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarda *M. nigra* yaprağı artan konsantrasyonda % 68 ile % 95 aralığında % inhibisyon gösterdi. Kuersetinin artan

konsantrasyonda % 59,55 ile % 91,17 aralığında aralığında % inhibisyon gösterdi (Şekil 4.5.2.).

DNA'daki aldehidikapurinik/apirimidinidik (AP) bölgeler, reaktif oksijen türleri tarafından doğrudan indüklenebilir ya da glikozilaz enzimlerinin neden olduğu okside edilmiş bazların çıkarılmasına neden olabilir. Bu floresans yoğunluğundaki artışla tespit edilir. Gözlenen absorbanstaki değişim, serbest radikalin aracılık ettiği DNA moleküllerinin eklenmesi veya ikame edilmesine bağlı olabilen glikozlu DNA'nın moleküler yapısındaki değişikliklere bağlıdır.

Artan floresans yoğunluğu DNA-AGE'nin (CEdG)'nin oluşumunu gösterir (Ashraf ve ark. 2012)

DNA-fruktoz sistemindeki AGE oluşumu floresanstaki artış, kuersetin ve *M. nigra* yaprakları ile AGE oluşumunun inhibisyonu floresanstaki azalış ile belirlendi (Şekil 4.5.1.).

5.4. UV Spektroskopi Çalışması

UV-1700 spektrofotometre kullanılarak 1 cm uzunluğundaki yolda ve 200-400 nm dalga boyu aralığında doğal, glikole olmuş DNA'nın üzerine farklı konsantrasyonlardaki *M. nigra* yaprağı ve etken maddesi kuersetinin etkisi örneklerin absorbsiyon ettiği dalga boyu aralıklarına bakılarak 260 nm'de hiperkromisiteleri hesaplandı.

$$\text{Hiperkromisite (\%H)} = [\ (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}\ ] \times 100$$

Tek iplikli DNA'nın absorpsiyonu (emilmesi), çift iplikli DNA'nın emiliminden daha yüksektir, bu bir hiperkromik etki olarak bilinir (daha fazla renk anlamına gelir). Çift sarmalda çiftlenmiş bazlar arasındaki hidrojen bağları, bazların aromatik halkasının rezonans davranışını sınırlar, bu da çift iplikli DNA'nın (hipokromik etki) UV absorbansında azalma ile sonuçlanır. Tek iplik DNA'da bazlar serbest formdadır ve çift iplikli DNA ile aynı konsantrasyonda % 40 daha yüksek absorbans (hiperkromik) ile sonuçlanan tamamlayıcı bazlar ile hidrojen bağlarını oluşturur.

Nükleik asitteki istiflenmiş bazlar arasındaki sıkı etkileşimler aynı miktarda serbest nükleotitlere oranla UV soğurmasında azalmaya yol açar. İki iplik eşleştiğinde de soğurma azalır. Buna hipokromik etki denir. Çift sarmallı nükleik asidin çözülmesi

de ters yönde etki eder; soğurmadaki artış hiperkromik etki olarak bilinir. Dolayısıyla çift sarmaldan tek zincirli, denatüre olmuş yapıya geçiş 260 nm'de UV soğurulması incelenerek izlenebilir. Nükleotid AGE formunda ortaya çıkan DNA'nın glikasyonu mutasyon sıklığında ve sitotoksisitede artış ile ilişkilidir (Akhter ve ark. 2013) (Şekil 4.6.1.).

M. nigra yaprağı 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarında % 19,724 ile %16,255 aralığında hiperkromisite gösterdi. Kuersetinin aynı konsantrasyonlarında %18,505 ile % 8,002 aralığında hiperkromisite gösterdi (Şekil 4.6.2.).

5.5. NBT İndirgenmesi

DNA glikasyonunda Amadori Ürünlerinin oluşumuna kadar olan süreç geri dönüşümlüdür. Glikasyon erken dönemlerde daha fazla olmak üzere konsantrasyona bağlıdır. Bundan dolayı diyabette yapımı artar (Singh ve ark. 2001).

DNA glikasyonun erken basamaklarında oluşan Amadori Ürünleri alkali ortamda NBT'yi indirgeyerek 525 nm''de absorbans veren mor renkli bir bileşik oluşturur. DNA'daki erken glikozlu ürünlerden fruktozaminin ölçümü için geliştirilmiş olan NBT indirgeme testi yapıldı.

AGE inhibisyonu; (%I)= [($A_{Kontrol} - A_{örnek}$) / $A_{Kontrol}$] x 100 formülü ile hesaplandı.

Glikasyon sırasında üretilen hidrojen peroksit, fenton reaksiyonu yoluyla yüksek derecede reaktif hidroksil radikaline dönüştürülebilir. Oksijen radikalleri, şekerin otomatik oksidasyonu prosesinde üretilir.

DNA'daki oksidatif hasara karşı hücresel koruma, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarla sağlanır.

Süperoksit varlığı NBT'nin azalması ile tespit edildi. Fruktozlanmış DNA'nın absorbansındaki artış, süperoksit radikalinin varlığını düşündürmektedir. Süperoksit oluşumunun nedeni, DNA'nın fruktoz ile glikasyonudur. *M. nigra* yaprağı ve

kuersetinin süperoksit radikalini inhibe ederek fruktozamin oluşumunu inhibe ettiği düşünüldü.

DNA-fruktoz sisteminde kullanılan *M.nigra* yaprağının fruktozamin oluşumunu; 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml konsantrasyonlarda, %21,97 ile % 32,48 aralığında inhibe ettiği tespit edildi. Kuersetinin fruktoz amin oluşumunu % 23,48 ile % 37,72 aralığında inhibibisyon etkisine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.7.).

DNA glikasyonunun diyet faktörü ile doğrudan ilişkili olduğu fruktozun DNA'daki süper kıvrımlı yapıyı, lineer form ve tek zincir kırığı formuna dönüştürmesi ile gözlemlendi

Robaszkiewicz ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada polifenolik bileşikler bir arada bulunduğunda sinerjik etki yaptığını ve prooksidant özellik gösterebileceğini belirlemişti *M. nigra* yaprağının da pro-oksidatif aktivite gösterebileceği düşünüldü. Artan konsantrasyonda *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı DNA kırıklarını arttırdı fakat. *M. nigra* yaprağının ana bileşenlerinden biri olan kuersetinin tek başınayken fruktoz kaynaklı DNA kesimini konsantrasyona bağlı olarak önleyebileceği gözlemlendi.

M. nigra yaprağı etanol ekstraktı ve flavonoidi kuersetinin; H_2O_2'in UV ile fotolizi sonucu oluşan OH radikalini yüksek konsantrasyonda söndürdüğü jel görüntüleme sistemi ile gözlemlendi.

NBT, UV ve floresans araştırmaları sonucunda, *M. nigra* yaprağı etanol ekstraktı ve flavonoidi kuersetinin; glikasyonun erken basamaklarında, serbest radikaller tarafından oluşturulan DNA hasarını, serbest radikalleri söndürme mekanizmasıyla inhibe ettiği düşünüldü. Bu çalışmanın daha sonra *in vivo* çalışmalarla desteklenerek endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığını sağlanması hedeflenmektedir.

,

6. KAYNAKLAR

Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007. Cyperus Rotundus Suppresses AGE Formation and Protein Oxidation in A Model of Fructose-Mediated Protein Glycoxidation. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 41, 572-578.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007, Inhibitory Effects of Ethyl Acetate Extract of Teucrium polium on in Vitro Protein Glycoxidation. ***Food and Chemical Toxicology***, 45(12): 2402-2411.

Bailey, C.J., Day, C. 1989. Traditional Plant Medicine as Treatments for Diabetes. ***Diabetes Care***, 12(8): 553–564.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2.baskı, ***Nobel Tıp Kitapevi***.

Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R. 1998. AGEs and Their Interaction with AGE-Receptors in Vascular Disease and Diabetes Mellitus. I. The AGE Concept. ***Cardiovascular Research***, 37: 586-600.

Birnboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**.** ***Nucleic Acids Research***, 24: 1513-1523.

Bischoff, H. 1994. Pharmacology of Alpha-Glucosidase Inhibition. ***European Journal of Clinical Investigation***, 24(S3), 3-10.

Bnouham, M., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. 2006. Medicinal Plants with Potential Antidiabetica a Review of Ten Years of Herbal Medicine Research (1990 – 2000), ***International Journal of Diabetes and Metabolism***, 14: 1-25.

Chandler, S. F., Dodds, J. H. 1983. The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasidine in Callus Cultures of Solanum lacinitum. ***Plant Cell Reports***, 2: 105.

Dominique, B.R. 2002. Glucose and Reactive Oxygen Species. ***Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care***, 5(5): 561-568.

Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. 2004. Fe(III) Reductive and Free Radical-Scavenging Properties of Summer Savory (Satureja hortensis L.) Extract and Subfractions. ***Food Chemistry***, 88(2): 193-199.

Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. ***Food Chemistry***. 2007; 103:1380-4.

Ercisli S, Tosun M, Duralija B, Voca S, Sengul M, Turan M. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra L.*) and Purple (*Morus rubra L.*) Mulberry **Genotypes.** ***Food Technology Biotechnology***. 2010; 48(1):102-6.

Fang, L., Cao, J., Duan, L., Tang, Y. ve Zhao, Y. 2014. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and -Glocosidase Inhibitory Activities of Schisandra Chinensis (Turcz.) Baill, ***Journal of Functional Foods***, 9: 264-270.

Finot, P.A., Magnenat, E. 1981. Metabolic Transit of Early and Advanced Maillard Products. ***Progress in Food & Nutrition Science***, 5: 193-207.

Fukuhara, K., Miyata N. 1998. Resveratrol As a New Type of DNA-Cleaving Agent. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***, 8(22): 3187-3192.

Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M. 2006. Advanced Glycation End Products. ***Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury Circulation***, 114: 597-605.

Grover, J.K., Yadav, S. Vats, V. 2002. Medicinal Plants of India with Antidiabetic Potential. ***Journal of Ethnopharmacology***, 81: 81–10.

Gulçin İ, Kufrevıoglu I.O, Oktay M. 2004. Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic Activities of Nettle (Urtica dioica L.). ***Journal of Ethnopharmcology***, 90(2-3), 205-215,

Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. ***Molecular Aspects of Medicine***, 27 1–93.

Guyton A. C, Hall J.E. 2001. Textbook of Medicinal Physiology. 1. baskı, ***Nobel Tıp Kitapevi***.

Hasenah, A., Houghton, P.J., Soumyanath, A. 2006. α-Amylase Inhibitory Activity of Some Malaysian Plants Used to Treat Diabetes; with Particular Reference to Phyllanthus amarus. ***Journal of Ethnopharmacology***, 107(3): 449-455.

Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2005. Interplay Between the Maillard Reaction and Lipid Peroxidation in Biochemical Systems. ***Annals New York Academy Of Sciences***, 1043(1): 319–326

Ho, S.C., Wu, S.P., Lin, S.M. 2010. Comparison of Anti-Glycation Capacities of Several Herbal Infusions with That of Green Tea. ***Food Chemistry***, 122(3): 768-774.

Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., Perfetti, R. 2004. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. ***Journal of Cellular Physiology***, 200(2): 177-200.

Jung, M., Park, M., Lee, H.C., Kang, Y.H., Kang, E.S., Kim, S.K. 2006. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. ***Current Medicinal Chemistry***, 13: 1203–1218.

Kim, J.S., Kwon, C.S., Son, K.H. 2000. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid. Bioscience, ***Biotechnology, and Biochemistry*** ,64(11): 2458-2461.

Kim, K., Kim, H., Kwon, J., Lee, S., Kong, Im, S.A., Lee, Y.H., Lee, Y.R., Oh, S.t., Jo, T.H., Lee, C.K., Kim, K. 2009. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Processed Aloe vera Gel in a Mouse Model of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. ***Phytomedicine***, 16(9): 856-863.

Kim, Y.M., Wang, M.H., Rhee, H.I. 2004. A Novel a-Glucosidase Inhibitor from Pine Bark ***Carbohydrate Research***, 339(3): 715-717.

Kızıl, M., Yılmaz, E.İ., Pirinççioğlu, N., Aytekin, Ç., 2003. DNA Cleavage Activity of Diazonium Salts: Chemical Nucleases. ***Turkish Journal of Chemistry***, 27: 539-54.

Kumar, R. S., Sivakumar, T., Sunderam, R. S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Murugesh, K., Kumar, K.A. 2005. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Bauhinia racemosa L. Stem Bark. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, 38: 1015-1024.

Kumar, R.S., Kumar, T.S., Gupta, M., Mazumder, U.K., Gomathi, P. 2004. Antioxidant and Protective Effects of Ervatamia coronaria stapf, Leaves Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury. ***European Bulletin of Drug Research***, 2(1): 12

Kwon, Y.I., Vattem, DV., Shetty, K. 2006. Evaluation of Clonal Herbs of Lamiaceae Species for Management of Diabetes and Hypertension. ***Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition***,15(1): 107-118.

Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K. 2008. *In Vitro* Studies of Eggplant (*Solanum melongena*) Phenolics As Inhibitors of Key Enzymes Relevant for Type 2 Diabetes and Hypertension. ***Bioresource Technology***, 99(8): 2981-2988.

Ledl, F., Schleicher, E. 1990. New Aspect of Maillard Reaztion in Foods and in the Human Body. ***Angewandte Chemie International Edition***, 29(6): 565-594.

Lo, K.M., Cheung, C.K. 2005. Antioxidant Activity of Extracts from the Fruiting Bodies of Agrocybe aegerita var. Alba. ***Food Chemistry***, 89(4), 533-539.

McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, et al. (1993) Maillard reaction products and theirrelation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. ***Journal of Clinical Investigators*** 91(6): 2470-2478.

Mycek, J.M., Harvey, R.A., Champe, P.C. 1998. Farmakoloji (Lippincott's Illustrated Review Serisi) 2. Baskı, ***Nobel Tıp Kitapevi***.

Nickavar, B., Abolhasani, L., Izadpanah, H. 2008. α-Amylase Inhibitory Activities of Six Salvia Species. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research***, 7(4): 297-303.

Nickavar, B., Mosazadeh, G., 2009, Influence of Three Morus Species Extracts on α-Amylase Activity. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research***, 8(2): 115-119.

Riehl, A., Nemeth, J., Angel, P., Hess, J. 2009. The Receptor RAGE: Bridging Inflamation and Cancer. ***Cell Communication and Signaling*** 7(12): 1-7.

Sharma, S.D., Pandey, B.N., Mishra, K.P. 2002. Amadori Product and Age Formation During Nonenzymatic Glycosylation of Bovine Serum Albumin In Vitro. ***Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics***, 6(4) : 233-242.

Silinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. ***American Journal of Enology and Viticulture***, 28: 49-55.

Singh, R, Barden A., Mori T. 2001. Advanced Glycation End-Products: ***A Review. Diabetologia***, 44:129-46.

Song, J. H., Simons, C., Cao, L., Shin, S.H., Hong, M., Chung, M. 2003. Rapid Uptake of Oxidized Ascorbate Induces Loss of Cellular Glutathione and Oxidative Stress in Liver Slices. ***Experimental and Moleculer Medicine***, 35(2), 67-75.

Tian, B., Hua, Y. 2005. Concentration-Dependence of Prooxidant and Antioxidant Effects of Aloin and Aloe-Emodin on DNA. ***Food Chemistry***, 91(3): 413-418 .

Turk, Z. 2010. Glycotoxines, Carbonyl Stress and Relevance to Diabetes and Its complications. ***Physiological Research***, 59: 147-56.

Qadir MI, Ali M, Ibrahim Z. Anticancer activity of Morus nigra leaves extract. ***Bangladesh J Pharmacol***. 2014; 9:4967.

Van Nguyen, C. 2006. Toxicity of the AGEs Generated from Maillard Reaction: on the Relationship of Food-AGEs and Biological-AGEs. ***Molecular Nutrition & Food Research***, 50(12): 1140-1149.

Wani A, Musthaq S, Ahsan H, Ahmad R. 2012. Biochemical Studies of *In Vitro* Glycation of Human DNA. ***Asian Journal Biomedical Pharmacology***. 2(13): 23-27.

Watson L, Dallwitz MJ. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval 1992 [cited 15 July 2015]. Available: ***delta-intkey.com***.

Wang, S.H., Chang, J.C., Chiou, R.Y.Y. 2011. Modified Fast Procedure for the Detection and Screening of Antiglycative Phytochemicals. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 59(13): 6906-6912.

Wang, L., Yen., J.H., Liang., H.I. 2003. Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn.). ***Journal of food and Drug Analysis***, 11: 60-66.

Yamaguchi, F., Ariga, T., Nakazawa, H. 2000. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from Garcinia indica Fruit Rind. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 48(2): 180-185

Yen, G.C., Hsieh, C.L. 1998. Antioxidant Activity of Extracts from Du-Zhong Eucommia ulmoides) toward Various Lipid Peroxidation Model In Vitro. ***Journal of Agricultural Food Chemistry***, 46(10): 3952-3957.

Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2005. Coordinate Contribution of Lipid Oxidation and Maillard Reaction to the Nonenzymatic Food Browning. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition*** 45(1): 49-59.

Zhang, L.S., Wang, X., Dong, L.L. 2011. Antioxidation and Antiglycation of Polysaccharides from Misgurnus anguillicaudatus. ***Food Chemistry***, 124(1): 183-187.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı **:** Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL

Doğum Tarihi **:** 01.06.1988

Uyruğu **:** T.C

Doğum Yeri **:** DİYARBAKIR

Medeni Hali **:** Evli

Adres **:** Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
21280-Diyarbakır

E-Mail **:** feryalakay@hotmail.com

EĞİTİM VE AKADEMİK KARİYER

Eylül 2009-Haziran 2015

Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Eylül 2016-Mevcut Tarih

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında " Karadut (*Morus nigra*) Yaprağı Etanol Ekstraktinin DNA Glikasyonuna Etkisi'adlı master tezini Prof. Dr. Göksel KIZIL danışmanlığında bitirdim.

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL
ÖĞRENCİ NO	16803006
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017/2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Kara Dut (*Morus nigra*) Yaprağı Etanol Ekstraktının DNA Glikasyonuna Etkisi
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	65
BENZERLİK ORANI	% 10
RAPORLAMA TARİHİ	07/06/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 65 sayfalık kısmına ilişkin, 07/06/ 2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %10 'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Feryal Zeliha AKAY BÜLBÜL

(İmza) 07/06/2018 Prof. Dr. Göksel KIZIL **Tez Danışmanı**	(İmza) 07/06/2018 Prof.Dr. Haluk AYDIN **Anabilim Dalı Başkanı**