



**RUTİN VE İZOKUERSİTRİN  
ANTIOKSİDANLARIN DNA OKSİDASYONUNA KARŞI  
ETKİLERİN İNCELENMESİ**

**Sam DAWBAA**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUTİN VE İZOKUERSİTRİN ANTİOKSİDANLARIN DNA  
OKSİDASYONUNA KARŞI ETKİLERİN İNCELENMESİ**

**Sam DAWBAA**

Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2017

## TEZ ONAYI

Sam DAWBAA tarafından hazırlanan "RUTİN VE İZOKUERSİTRİN ANTİOKSİDANLARIN DNA OKSİDASYONUNA KARŞI ETKİLERİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

**Başkan:** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Elif TÜMAY ÖZER  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Şerife SAÇMACI  
Erciyes Ü. Fen Fakültesi,  
Kimya Anabilim Dalı

İmza

İmza

İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali BAYRAM**

**Enstitü Müdürü**

9.5.2019 (Tarih)

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazın kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normalara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifte yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışma olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**09/04/2017**

**Sam DAWBAA**



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### RUTİN VE İZOKUERSİTRİN ANTIOKSİDANLARIN DNA OKSİDASYONUNA KARŞI ETKİLERİN İNCELENMESİ

**Sam DAWBAA**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Oksidatif stres, DNA hasarının en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilir ve kanser oluşumu, mutasyon, yaşlanma gibi bir dizi ara süreç yoluyla hücre ölümüne neden olur. Bitki ve meyve gibi doğal kaynaklar, hücrelerin genetik materyalini oksidasyona karşı korumak için kullanılabilir antioksidan maddeleri içerirler. Bu çalışmada, *Vitis vinifera* (alfons)'un sürgünlerinde bulunan antioksidan maddeler ekstrakte edilerek oksidasyon sonucu oluşan DNA hasar ürünlerinin oluşumu üzerine etkisi GC-MS/MS ile tayin edilmiştir. Ayrıca, Folin-Ciocalteu ve CHROMAC yöntemleri kullanılarak ekstraktın toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Toplam fenol değeri  $7,83 \pm 0,08$  mg GAE/g taze ağırlık ve antioksidan kapasitesi  $8,17 \pm 0,49$  mg TE/g taze ağırlık olarak tayin edilmiştir. Bitki ekstraktının HPLC-DAD ile yapılan nitel analiz sonucu ekstraktın içinde rutin ve izokuersitrin olmak üzere iki flavonoid glikozitin ve klorojenik asitin bulunduğunu ortaya koymuştur. DNA oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi, farklı konsantrasyonlarda standart rutin ve izokuersitrin çözeltileri ile ekstraktın oksidatif stres altında buzağı timus DNA'sına uygulandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. On sekiz DNA oksidasyon ürünü yüksek duyarlılıkla GC-MS/MS kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar, oksidatif strese karşı koruyucu bir madde olarak *Vitis vinifera* (alfons) sürgününün ekstraktı kullanıldığında, DNA oksidasyon ürünlerinin miktarında önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, *V. vinifera* (tür: alfons)'un sürgünlerinin iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, günlük sağlıklı yiyecek listesinin bir parçası olarak kullanılması önerilebilir.

**Anahtar kelimeler:** *V. vinifera* sürgünü, GC-MS/MS, oksidatif stres, DNA oksidasyonu, rutin, izokuersitrin.

**2017, ix + 59 sayfa.**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### STUDY OF THE ANTIOXIDANT EFFECTS OF RUTIN AND ISOQUERCITRIN AGAINST THE OXIDATION OF DNA

**Sam DAWBAA**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Oxidative stress is being considered as one of the significant causes of DNA damage which in turn contributes to cell death through a series of intermediate processes such as cancer formation, mutation, and aging. Natural sources such as plant and fruit products have provided us with interesting substances of antioxidant activity that could be recruited in protecting the genetic materials of the cells. This study is an effort to discover some of those antioxidants and determine the direct antioxidant activity of the substances contained in the Tendrils of *Vitis vinifera* (var. alphonse) by extracting them and performing an ultrasensitive determination of the products of DNA oxidation using GC-MS/MS. In addition, Folin-Ciocalteu and CHROMAC tests was carried out to determine the total phenolic content and the antioxidant capacity of the extract, respectively; results revealed a phenolic content of  $7.83 \pm 0.08$  mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g of the plant's fresh weight (FW) by Folin-Ciocalteu and  $8.17 \pm 0.49$  mg Trolox Equivalent (TE)/g FW by CHROMAC assays. The qualitative analysis of the plant extract by HPLC-DAD technique revealed that two flavonoid glycosides namely rutin and isoquercitrin in addition to chlorogenic acid were contained in the extract. The determination of the DNA oxidation products was performed after putting calf thymus DNA, rutin, isoquercitrin standard samples with different concentration, and the extract's sample under oxidative stress. Eighteen DNA oxidation products were traced using GC-MS/MS with ultra-sensitivity and the experiments proved a significant decrease in the concentration of the DNA oxidation products when the extract was used as a protectant against the oxidative stress. It is believed by conclusion that the extract of *V. vinifera* (var. alphonse)'s tendrils has a good antioxidant activity; hence it is recommended to be used as a part of the daily healthy food list if possible.

**Keywords:** *V. vinifera* tendrils, GC-MS/MS, oxidative stress, DNA oxidation, rutin, isoquercitrin.

**2017, ix + 59 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez aşamaları süresince bana her zaman çok yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e saygı ve şükranlarımı sunar, deneyimi ve rehberliği için çok teşekkür ederim.

Değerli hocam Prof. Dr. Cevdet DEMİR'e tez çalışmaları boyunca danışmanlık desteği ve cesaretlendirdiği için sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bana laboratuvarında rehberlik yapan Dr. Önder AYBASTIER'e yardımı, desteği, sınırsız sabrı ve cesaret verdiği için çok teşekkür ederim. Çiğdem YÜKSEL'e laboratuvarındaki çalışmalarım boyunca yardımları ve gösterdiği çabalar için teşekkür ederim. Büşra KARKAR ve Nevim ÇALIŞKAN'a da teşekkür ederim.

Türkiye Bursları Programı, Yurtdışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığı desteği ile Türkiye Cumhuriyeti'nde Yüksek Lisans eğitimimi devam ettirme şansım oldu, bu nedenle sonsuz teşekkürlerimi kabul etmelerini umuyorum.

Bu tezi (2014/5) numaralı proje ile destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Aileme, verdikleri destek ve daima teşvik ettikleri için sonsuza kadar şükranlarımı sunarım.

Bu tezin deneysel çalışmaları ilk tez danışmanım Prof. Dr. Cevdet DEMİR danışmanlığında yürütülmüştür.

Sam DAWBAA

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. DNA Oksidasyonu ve Oksidatif Stres.....	3
2.1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	3
2.1.2. Hücredeki ROS üretilmesi.....	4
2.1.3. Oksidatif stres.....	5
2.1.4. DNA oksidasyonu ve hasarı.....	6
2.1.5. DNA oksidatif hasarının onarım yöntemleri.....	9
2.1.6. Oksidatif strese bağlı hastalıklar.....	10
2.1.7. DNA hasar ürünlerinin analiz yöntemleri.....	12
2.2. Antioksidanlar.....	14
2.2.1. Doğal ve sentetik antioksidanların oksidatif stresi azaltmadaki rolü.....	15
2.2.2. Doğal antioksidanlar olarak fenolik bileşikler.....	16
2.2.3. Antioksidan kapasitesi ölçme yöntemleri.....	19
2.3. <i>Vitis vinifera</i> (Asma).....	22
2.3.1. Sınıflandırma ve genel bilgiler.....	22
2.3.2. <i>Vitis vinifera</i> 'nın farklı kısımlarında bulunan kimyasal bileşenler.....	23
2.3.3. <i>Vitis vinifera</i> (alfons) sürgünleri.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kimyasallar.....	26
3.1.2. Çözeltiler.....	27
3.1.3. Örnek Hazırlama.....	29
3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	30
3.1.4.1. Aletler.....	30
3.1.4.2. Ultraviyole-görünür (UV/VIS) spektrofotometre.....	30
3.1.4.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi.....	31
3.1.4.4. Gaz kromatografi – kütle spektrometre / kütle spektrometre.....	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Folin-Ciocalteau (FC) Yöntemi.....	31
3.2.1.1. Folin-Ciocalteau yöntemi için kalibrasyon grafiği hazırlama.....	31
3.2.1.2. <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktının toplam fenol içeriği.....	32
3.2.2. CHROMAC Antioksidan Kapasite Yöntemi.....	33
3.2.2.1. CHROMAC yöntemi için kalibrasyon grafiği hazırlama.....	33
3.2.2.2. <i>V. Vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktının antioksidan kapasitesi.....	34
3.2.3. <i>V. vinifera</i> (alfons) Sürgün Ekstraktının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizi.....	34
3.2.3.1. <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktının nitel analizi.....	35
3.2.3.2. Nicel analiz için kalibrasyon grafiği.....	35



3.2.4. Antioksidanların DNA Oksidatif Stresine Etkileri.....	37
3.2.5. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre (GC-MS / MS) Analizi.....	38
3.2.5.1. Analiz yöntemi.....	38
3.2.5.2. Gaz Kromatografi - Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre analizi için kalibrasyon grafikleri.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Toplam Fenol İçeriği (TPC).....	41
4.2. Sürgün Ekstraktı İçin Antioksidan Kapasitesi.....	42
4.3. Sürgün Ekstraktındaki Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	42
4.4. Gaz Kromatografi - Kütle Spektrometre / Kütle Spektrometre Analizi ile Oksidatif Stresin DNA'ya Etkilerinin Belirlenmesi .....	44
5. SONUÇ.....	50
KAYNAKÇA.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	59



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\gamma$	Gama
$\alpha$	Alfa
Kg	Kilogram
L	Litre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir

### Kısaltmalar

1,5-DFK	1,5-Difenilkarbazit
28DHA	2,8-Dihidroksiadenin
2HA	2-Hidroksiadenin
46D5FP	4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin
46D5NP	4,6-Diamino-5-nitropirimidin
56DHT	5,6-Dihidrotiamin
56DHU	5,6-Dihidrourasil
5FU	5-Formilurasil
5H5MH	5-Hidroksi-5-metilhidantoin
5HC	5-Hidroksisitosin
5HH	5-Hidroksihidantoin
5HMC	5-(Hidroksimetil)sitosin
5HMU	5-(Hidroksimetil)urasil
5HU	5-Hidroksiurasil
8HA (8-OH-Ade)	8-Hidroksiadenin
8OHG (8-OH-Gua)	8-Hidroksi-2-deoksiganin
ABTS	2,2'-azo-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
Alx	Alloksan
ADP	Adenozin difosfat
AP-bölgesi	Abazik bölgesi
ATP	Adenozin trifosfat
BER	Baz-eksizyon onarımı
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid
CHROMAC	Cr (VI) indirgen antioksidan kapasite
CUPRAC	Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
CVD	Kalp-damar hastalıkları
Cyt gly	Sitozin glikol
DNA	Deoksiribonükleik asit

DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
dw	Kuru ağırlık
EI	Elektron iyonizasyonu
ER	Endoplazmik retikulum
ESR	Elektron spin rezonansı
ETC	Elektron aktarma zinciri
Ekst	Ekstrakt
FapyAde	4,6-Diamino-5-formamidopirimidin
FapyGua	2,6-Diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
FC	Folin-Ciocalteau
FRAP	Fe (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
FW	Kuru ağırlık
ABTS	2,2'-azo-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic asit)
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC-MS/MS	Gaz kromatografisi – tandem kütle spektrometre
Gh	5-Guanidinohidantoin
Iq	İzokuersitrin
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi – tandem kütle spektrometre
LOD	Gözlenebilme sınırı
Me <sub>3</sub> Si	Trimetilsilil
MMR	Uyumsuzluk onarımı
MOP	Myeloperoksidase
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NER	Nükleotid-eksizyon onarımı
NOX	NADPH oksidaz kompleks
ORAC	Oksijen radikal absorban kapasite
PA	Pik alanı
R	Rutin
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
Sp	Spiroiminodihidantoin
TE	Troloks eşdeğeri
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
Thy gly (TG)	Timin glikol
TMCS	Trimetilklorosilan
TPC	Toplam fenol içeriği

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.2.3.1.</b> Antioksidan kapasitesini değerlendirmek için sıkça kullanılan yöntemler.....	20
<b>Çizelge 2.2.3.1.</b> Antioksidan kapasitesini değerlendirmek için sıkça kullanılan yöntemler (Devam) .....	21
<b>Çizelge 2.3.1.1.</b> Asma ağaçlarının bilimsel sınıflandırılması.....	22
<b>Çizelge 3.1.1.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	26
<b>Çizelge 3.1.1.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar (devam).....	27
<b>Çizelge 3.1.4.1.1.</b> Çalışmada kullanılan aletler.....	30
<b>Çizelge 3.2.1.1.1.</b> Gallik asit konsantrasyon değerleri ve absorbanları.....	32
<b>Çizelge 3.2.2.1.1.</b> Troloks konsantrasyon değerleri ve absorbanları .....	33
<b>Çizelge 3.2.3.1.</b> HPLC-DAD çalışma koşulları .....	35
<b>Çizelge 3.2.3.2.1.</b> HPLC nicel analizi için kalibrasyon grafiği değerleri.....	36
<b>Çizelge 3.2.5.2.1.</b> DNA oksidatif baz hasar ürünleri için kalibrasyon grafiği denklemleri ve çalışılan doğrusal aralık değerleri.....	40
<b>Çizelge 4.1.1.</b> Ekstraktın Folin-Ciocalteu ve CHROMAC yöntemleri kullanılarak bulunan toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitesi değerleri.....	41
<b>Çizelge 4.3.1.</b> 50 mL <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktında bulunan klorojenik asidin HPLC-DAD nicel sonuçları.....	43
<b>Çizelge 4.3.2.</b> 50 mL <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktında bulunan rutin HPLC-DAD nicel sonuçları.....	43
<b>Çizelge 4.3.3.</b> 50 mL <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktında bulunan izokuersitrinin HPLC-DAD nicel sonuçları.....	44
<b>Çizelge 4.4.1.</b> Kontrol numunelerindeki DNA hasar ürünleri (ng/mg DNA) ve alıkonma zamanı değerleri.....	45
<b>Çizelge 4.4.2.</b> Oksidatif stres ortamı altında numunelerdeki (Fenton ortamı: 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and 100 µM Fe <sup>2+</sup> içerir) DNA hasar ürünleri (ng/mg DNA) değerleri...	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1.2.1. ROS'un hücresel üretiminin şeması.....	4
Şekil 2.1.2.2. Nötrofillerdeki mitokondri tarafından ROS'un üretilmesi.....	5
Şekil 2.1.4.1. DNA'daki hidroksil radikalının saldırma bölgeleri.....	7
Şekil 2.1.4.2. Oksidasyon yoluyla üretilen DNA hasar ürünlerinin yapıları.....	9
Şekil 2.2.2.1. Flavonoidler, fenolik asitler ve tanenlerin yapıları.....	17
Şekil 2.2.2.2. Stilben ve lignanların yapıları.....	18
Şekil 2.3.3.1. <i>V. vinifera</i> (alfons) (a) normal sürgünler ve (b) destekleyici bir telin üzerini saran sürgünler .....	24
Şekil 2.3.3.2. (A) Rutin ve (B) izokuersitrinin kimyasal yapıları.....	25
Şekil 3.1.3.1. <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgünleri (a) parçalanmadan önce ve (b) parçalandıktan sonra.....	29
Şekil 3.2.1.1.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 3.2.2.1.1. CHROMAC için kalibrasyon grafiği.....	34
Şekil 3.2.3.2.1. Klorojenik asidin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.2.3.2.2. Rutinin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.2.3.2.3. İzokuersitrinin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği.....	37
Şekil 4.3.1. (a) 60 mg/L standart klorojenik asit, rutin ve izokuersitrin (b) <i>V. vinifera</i> (alfons) ekstraktının 280 nm'de HPLC-DAD kromatogramları .....	43
Şekil 4.4.1. 20 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve 10 µM Fe <sup>2+</sup> içeren ortamdaki DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı .....	47
Şekil 4.4.2. Standart rutin ve <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktının DNA oksidatif hasar ürünleri oluşumuna etkisi .....	49
Şekil 4.4.3. Standart izokuersitrin ve <i>V. vinifera</i> (alfons) sürgün ekstraktının DNA oksidatif hasar ürünleri oluşumuna etkisi .....	49

## 1. GİRİŞ

Onlarca yıl önce oksidatif stres teorilerinin ortaya çıktığı ve oksidasyonun DNA bütünlüğünün üzerine etkisi tespit edildiğinden beri bu problemin nedenlerini bulup çözmek için bilimsel araştırmalar devam etmektedir. Çünkü DNA oksidasyonu sonuçlarının önemli kardiyovasküler (Hertog ve ark. 1993, Yochum ve ark. 1999) ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar (Singh ve ark. 2004), ayrıca kanser (Somasundaram ve ark. 2016, Wojtunik-kulesza ve ark. 2016) ve yaşlanma problemleri (Fuentes ve Palomo 2016, Maurya ve ark. 2016) ile ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır. Oksidatif stres, aşırı miktardaki reaktif oksijen ve/veya azot türlerinin (örn. süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit) vücudun endojen antioksidan kapasitesini yetersiz bırakarak enzimler, proteinler, DNA, lipidler ve benzeri biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olan dengesiz bir durumdur (Dai ve Mumper 2010).

Birçok çalışmada, oksidasyon ile hasar gören biyolojik molekülleri koruyabilen antioksidanlar araştırılmış ve bitkiler başta olmak üzere doğal kaynakların bu ajanlar açısından zengin olduğunu bulunmuştur. Flavonoid glikozitler ve türevlerinin, doğal kaynaklı iyi bilinen antioksidanlar arasında olduğu belirlenmiştir (Silva ve ark. 2002). Flavonoidler; antosiyaninler, flavonlar, flavonollar, flavanonlar, dihidroflavonollar, çalkonlar, auronlar, flavan ve proantosiyaninler, izoflavonoidler, biflavonoidler gibi çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Bu maddelerin, bitkilerin farklı kısımlarında, alglerde ve bazı mantar türlerinde büyük miktarda bulunduğu bilinmektedir (Iwashina 2000).

Flavonol glikozit olan rutin ve izokuersitrinin (Iwashina 2000) iyi antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir (Iacopini ve ark. 2008, Jung ve ark. 2010). Rutin ve izokuersitrin başta olmak üzere çeşitli flavonoid glikozitlerin, *Vitis vinifera*'nın farklı türleri içinde bulunduğu gösterilmiştir. Rutin ve izokuersitrin, kuersitinin glikozitleridir ve kuersetin disakkarid ramnoglukozu ve glikozu bağlayarak rutin ve izokuersitrini oluşturur (Makris ve ark. 2006). Rutin, kuersetinin 3 pozisyonunda ramnosid (ramno-glikoz) eklenmesiyle biyosentezlenir (Barber ve Behrman 1991). Izokuersitrin, rutin biyosentezinde bir ara bileşiktir. Flavonoid-3-O-glukosiltransferaz, rutin biyosentezinde glukoz ve ramnozun aktarılmasından sorumlu enzimdir (Lucci ve Mazzafera 2009).

*V. vinifera*'nın (asma) meyvesi çoğunlukla gıda amacıyla kullanılırken çekirdekleri ve yaprakları bitkisel ilaçlarda ve besin takviyelerinde kullanılmaktadır (Fraternale ve ark. 2016). Asma sürgünleri, besin açısından önemsiz bir kısımdır, ancak asma sürgünlerinin bazı bölgelerde yiyecek olarak tüketildiği bildirilmektedir. Oszmianski and Lee (1990), kırmızı üzümün Chaunac tipinin ortalama 51,4 mg kg<sup>-1</sup> rutin ve 22,1 mg kg<sup>-1</sup> izokuersitrin (kuersetin glikoziti), Concord tipinin ise 21,7 mg kg<sup>-1</sup> izokuersitrin içerdiğini bildirmiştir. Bu sonuçlara benzer, Cantos ve ark. (2000) tarafından elde edilen sonuçlara göre asmanın Napoleon table türü üzümün dış kabuğunun flavonol içeriği 21,6 mg kg<sup>-1</sup> belirlenmiştir. Yapılan tüm çalışmalar (Rodríguez Montealegre ve ark. 2006), *V. vinifera*'nın farklı türlerinin yüksek miktarda flavonoid içeriğini belirtmektedir. *V. vinifera*'nın ağaçlarının meyveler dışındaki kısımları, flavonoidler ve diğer polifenollerini içermeye ihtimaline sahip olduklarından dolayı ilgi çekmektedir. Bu nedenle üzüm çekirdekleri polifenol içeriği açısından araştırma konusu olmuştur (Delaunay ve ark. 2002, Yılmaz ve Toledo 2004, Bucić-Kojić ve ark. 2007, Ghafoor ve ark. 2009). Asmanın yapraklarının fenolik içeriği hakkında da bilgiler elde edilmiştir (Grape 1990, Kolb ve ark. 2001, Katalinić ve ark. 2009, Fernandes ve ark. 2013). Asma ağaçlarının gövdelerinin, antioksidan aktiviteye sahip flavonoid ve polifenol bileşiklerini içerdiği gösterilmiştir (Grape 1990, Pussa ve ark. 2006, Domínguez-Perles ve ark. 2014, Wenzel et al. 2015). Ayrıca asma sürgünleri kimyasal bileşim ve antiinflamatuvar etkinlik açısından incelenmiştir (Fraternale ve ark. 2016).

Bu çalışmada, HPLC-DAD kullanılarak *V. vinifera* (alfons)'un sürgünlerinin kimyasal içeriği araştırılmış ve sürgünlerde bulunan iki flavonoid rutin ve izokuersitrinin buzağı timüs DNA'sının oksidasyonunu önleme kabiliyeti test edilmiştir. DNA oksidasyon ürünlerini tayin etmek için yüksek duyarlı GC-MS/MS analiz sistemi kullanılmıştır. Ayrıca, Folin-Ciocalteu ve CHROMAC yöntemleri kullanılarak ekstraktın toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. DNA Oksidasyonu ve Oksidatif Stres**

#### **2.1.1. Reaktif oksijen türleri ROS**

İnsan vücudu DNA, protein, lipid hasarı ile hücrelerin oksidasyonuna yol açan çeşitli ajanların etkilerine maruz kalır. DNA oksidasyon kaynakları iki şekilde sınıflandırılabilir (Kryston ve ark. 2011):

- i. İyonlaştırıcı radyasyonlar (örn. ultraviyole, X-,  $\gamma$ -, ve  $\alpha$ -parçacıklar) ve yükseltgen kimyasallar (örn. benzo[a]piren gibi ekzojen ajanlardır).
- ii. Metabolik ve inflamatuvar süreçler gibi farklı hücre içi ve fizyolojik süreçlere karşılık gelen endojen kaynaklardır.

Reaktif oksijen türleri (ROS) bu kaynaklardan ortaya çıkıp hasara yol açmaktadır. En önemli ROS, yüksek reaktif hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) içermektedir. ROS geniş bir terim sayılır ve hidrojen peroksit, özgür tek elektron olmayan lipid peroksitler, süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), peroksil ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), alkoksi ( $\text{RO}^{\cdot}$ ), azot oksit ( $\cdot\text{NO}$ ), azot dioksit ( $\cdot\text{NO}_2$ ), peroksinitrit ( $\cdot\text{ONOO}^{\cdot}$ ) radikallerini, ozon ( $\text{O}_3$ ) ve muhtemelen singlet oksijen içermektedir (Mani 2015). İndirgen ve yükseltgenin kimyasal terimler olduğu, biyoloji literatüründe ise antioksidan ve pro-oksidan olarak bilinmektedir (Kohen ve Nyska 2002). ROS'un nötralize edilmesi için canlı hücreler C vitamini, E vitamini ve fenolik bileşikler gibi doğal antioksidanlar içermektedir. Bu doğal antioksidanlar güçlü indirgeme aktivitesine sahip olduklarından ROS'u nötralize edip kendisi daha az reaktif radikal haline gelerek DNA ve diğer biyomoleküllere zarar vermemektedir. Bu indirgen moleküllerin etkili olduğu ancak yeterli olmadığı kabul edilir, bu yüzden vücut kendi hücrelerini savunmak için glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler dahil olmak üzere daha karmaşık yöntemler uygulamaktadır (Evans ve ark. 2004).

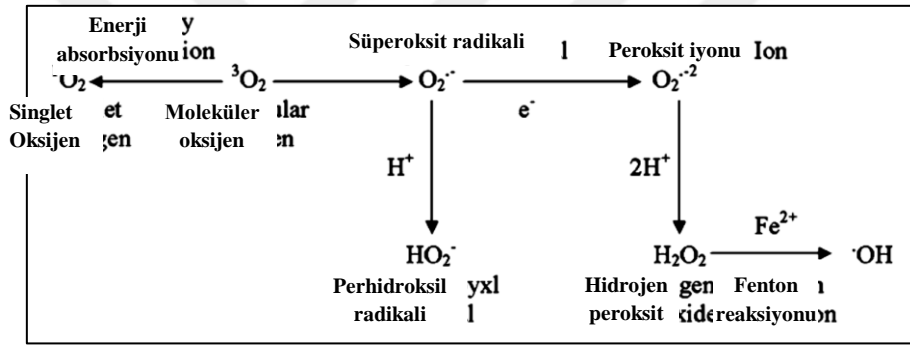
### **2.1.2. Hücredeki ROS üretilmesi**

Hayvan ve bitki organizmalarının birçok hücresi solunumdan sorumlu organellere sahiptir; bunlara Mitokondri denir (tekil: Mitokondrion). Mitokondri adenosin trifosfat (ATP) üretmek için diğer metabolik substratlar ile birlikte moleküler oksijeni tüketir ve bu süreç boyunca su ve karbondioksit yan ürünler olarak ortaya çıkar. ATP mitokondri içinde üretildiğinden dolayı mitokondriye "energy houses, yani enerji evleri" denir. Mitokondrinin hücre sel solunuma katkıda bulunan fizyolojik görevleri nedeniyle mitokondri ROS üretiminin ana kaynağı olarak sayılmaktadır. Endoplazmik retikulum (ER) ve peroksizomlar gibi diğer hücre sel organeller

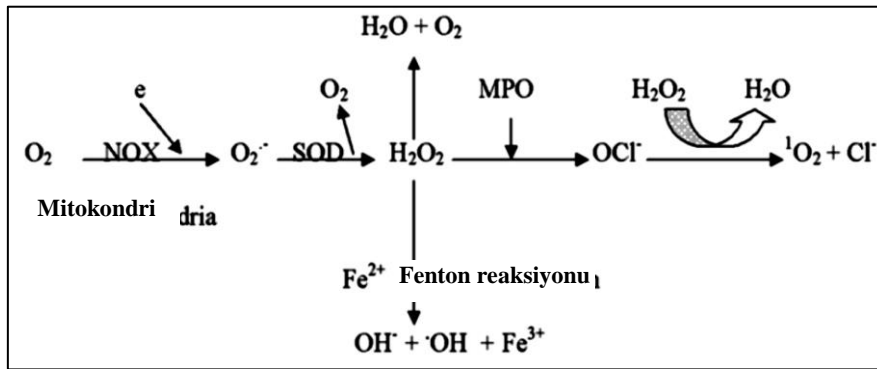


de ROS'u üretebilirler (Chance ve ark. 1979). ER, hücrel çekirdek zarına bağılı lipid ve proteinin üretiminde rol oynayan bir hücre içi organeldir. Peroksisomlar, peroksiti üreten enzimleri içeren ve yağ asıı oksidasyonunda rol oynayan organellerdir. Peroksisomlar, toplam hücrel hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretimini önemli bir kaynağıdır (Mani 2015).

Mitokondri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi elektron vericilerden  $O_2$ 'ye dört elektronu Elektron Aktarma Zinciri (ETC) vasıtasıyla vererek oksijeni suya indirgeyip ATP'yi üretir. Mani (2015) tarafından değinildiğine göre;  $O_2$ 'nin %95'i serbest radikal ara maddeleri olmadan  $H_2O$ 'ya dörtlü eşdeğerlik yoluyla indirgenir (Chance ve ark. 1979, Shigenaga ve ark. 1994). Kalan oksijenin %5'i serbest radikali üreten tek değerk indirgeme yoluyla indirgenir (Şekil 2.1.2.1.). Mitokondrinin ROS'u (Şekil 2.1.2.2.) ETC erken süreçleri sırasında özellikle Kompleks I ve Kompleks III arasında üretilmektedir (Mani 2015).



Şekil 2.1.2.1. ROS'un hücrel üretimini şeması (Bhattacharya 2015'dan değıştırılarak alınmıştır)



Şekil 2.1.2.2. Nötrofillerdeki mitokondri tarafından ROS'un üretilmesi. NOX: NADPH oksidaz kompleksi, SOD: süperoksit dismutaz, MOP: Miyeloperoksidaz (Bhattacharya 2015'dan değıştırılarak alınmıştır)

### 2.1.3. Oksidatif stres

Oksidatif stres, ROS ile oksidasyona karşı savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Toaldo ve ark. 2016). Ancak dengesizliğin değişimi, ROS gibi pro-oksidan maddenin artmasına doğrudan bağlıdır. Diğer açıdan, değişim antioksidanın artmasını tercih ederse, durum indirgeyici stres olarak tanımlanır ve hasara da neden olabilir (Kohen ve Nyska 2002).

Orrenius ve ark. (1989), oksidatif stresin memeli hücresindeki serbest  $Ca^{2+}$  ve demir seviyelerinin artmasına neden olduğunu bildirmiştir. Hücre içi aşırı serbest  $Ca^{2+}$  artışı endonükleazları aktive ederek DNA parçalanmasına neden olabilir. Endonükleaz aktivasyonu DNA tek- ve çift-sarmal kırıklarına neden olarak DNA onarımı, p53 ve poli-ADP ribosilasyonunda esas olan nükleer proteinlerin artmasına yol açar. Ayrıca, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyelerinin değişimi kromatin organizasyonunu etkileyip gen ekspresyonunu başlatır ve proteaz ve protein kinaz aktivitelerini etkileyebilir (Bhattacharya 2015). Bu olaylara ek olarak, hücre içindeki diğer moleküler ve biyokimyasal değişiklikler da ortaya çıkabilir ve hücrede büyüme (artan çoğalma), inflamasyonun başlatılması ve ilerlemesi (adaptasyon), hücresel engelleme (hücrenin bölünememesi), hücre yaralanması ve programlanmış hücre ölümü dahil olmak üzere anormal biyolojik olaylara neden olmaktadır (Dholia ve ark. 2015). Oksidatif stres, belirli yöntemler yoluyla büyüklüğünü ölçme kabiliyeti; koruyucu tıp, hastalık yönetimi, patolojilerdeki ilgili terapilerin kontrolü, yaşlanma karşıtı alanlar, yaşam tarzı değişiklikleri ve klinik araştırmaların izlenmesine katkıda bulunarak halk sağlığı için temel önem taşımaktadır (Palmieri ve Sblendorio 2010).

#### **2.1.4. DNA oksidasyonu ve hasarı**

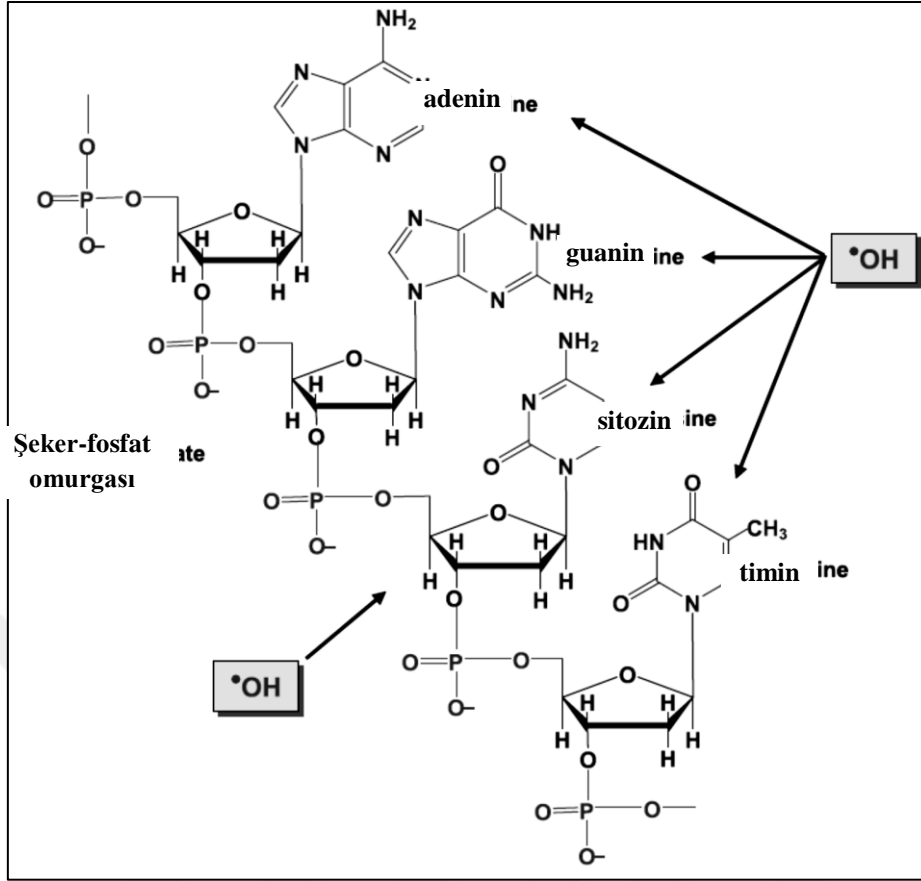
1984 yılında Fenton (Fenton 1894),  $Fe^{2+}$  ve  $H_2O_2$  arasındaki etkileşimi tanımladı (Denklem 2.1.4.1). Bundan sonra, bu reaksiyondaki gözlemlenen yükseltgen etkilere katkıda bulunan hidroksil radikali bu reaksiyondan da üretilmiştir (Denklem 2.1.4.2) (Haber and Weiss 1934). Geçiş metallerin çoğunluğu, bakır ve demir dahil ve çinko hariç olmak üzere, radikallerin kimyasına yükseltgenleri güçlü radikaller dönüştürerek katılabilirler. Metal iyonların Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları gibi tepkimeye katılabilmeleri için protein, DNA ve diğer biyolojik makromoleküller veya şelatların yüzeyine bağlı olmaları şarttır (Kohen ve Nyska 2002).



Haber-Weiss reaksiyonundan üretilen hidroksil radikali, oksijen radikallerinin zararlı etkilerinin çoğalmasına neden olur. Haber-Weiss reaksiyonunda demir (III) (normal fizyolojik pH'daki demir (III) iyonları halinde bulunmaktadır) demir (II)'e süperoksit radikali vasıtasıyla indirgenir. Demir (II) ise  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek  $\cdot OH$ 'u üretir (Denklem 2-2) (Kohen ve Nyska 2002).

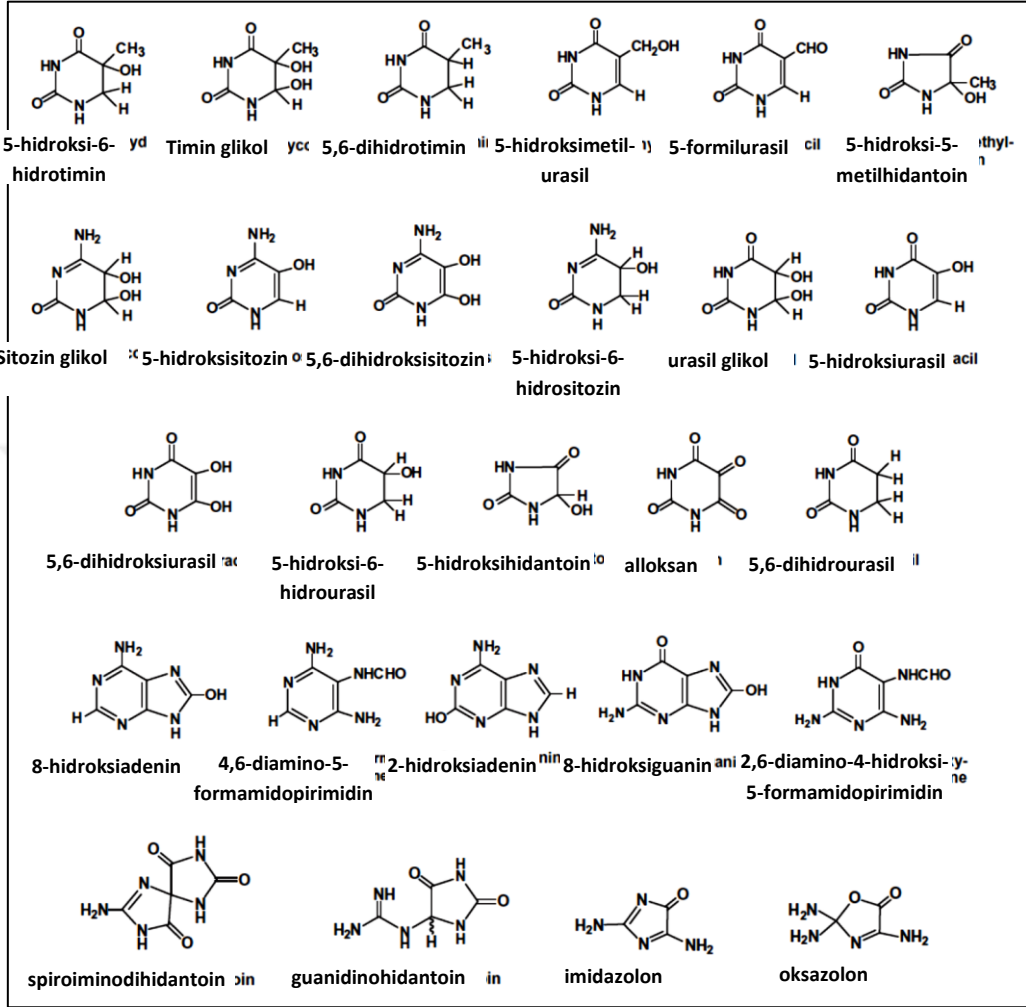
Ortaya çıkan hidroksil radikali çift bağlara eklenerek ve özel 2'-deoksi-riboz kısımlarından bir  $H^{\cdot}$ 'i kaldırarak DNA'nın purinleri (Adenin ve Guanin) ve pyrimidinleri (Sitozin ve Timin) ile reaksiyona girebilir (Şekil 2.1.4.1) (Dizdaroglu 2012).

Purinlerin (Guanin ve Adenin) çeşitli adüktleri  $\cdot OH$ 'nin katılım reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) ve 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua) purin C8-OH-adükt radikalleri tek elektron oksidasyon yoluyla çıkarken, 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (FapyAde) ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) halka açma ve aynı adükten (C8-OH-adükt) bir elektron indirgenmesi ile çıkarlar. Yükseltgen ajanlar 8-hidroksipurinlerin oluşumunu artırırken, formamidopirimidinler indirgeme koşulları altında kendilerinin oluşmalarını tercih ederler (Steenken 1989, Evans ve ark. 2004, Dizdaroglu 2012). Guanin ve 8-OH-guanin'in oksidasyonu bir hidantoin ürünü olan spiroiminodihidantoin (Sp) oluşumuna sebep olur (Neeley ve Essigmann 2006, Dizdaroglu 2012). 8-OH-guanin'in daha fazla okside olması 5-guanidinohidantoin (Gh)'in oluşumunu sağlamaktadır (Neeley and Essigmann 2006).



**Şekil 2.1.4.1.** DNA'daki hidroksil radikalının saldırma bölgeleri (şekil Dizdaroglu 2012'dan değiştirilerek alınmıştır)

C5-OH- ve C6-OH-adükt radikalleri, pirimidinlerin (Sitozin ve Timin) C5-C6-çift bağlarına hidroksil radikali ilavesi ile sonuçlanır. Timin'in metil grubundan bir H'nin kaybetmesiyle oluşur ve bir alil radikalının oluşmasına yol açar (Dizdaroglu 2012). C5-OH-adükt radikalleri yükseltgen özelliğe, C6-OH-adükt radikalleri ise indirgeme özelliğine sahiptir (Steenken 1987). Timin glikol (Thy gly) ve Sitozin glikol (Cyt gly), C5-OH- ve C6-OH-adükt radikallerinin oksidasyonu ardından su eklenmesi ve proton kaybetmesiyle üretilirler (Evans ve ark. 2004). 5-(hidroksimetil)urasil ve 5-formilurasil, timin alil radikalının oksidasyonu ile üretilirler. 5,6-Dihidroksisitozin, alloksan (Alx), 5-hidroksi-5-metilhidantoin (5-OH-5-MeHyd) ve 5-hidroksihidantoin, pirimidin hidroksihidroperoksitlerin ayrışmasından oluşurlar. Cyt gly ve diğer sitozin ürünlerinden kolayca su ve amin grubu kaybederek 5-hidroksisitozin (5-OH-Cyt), Ura glikol (Ura gly), 5-hidroksiurasil (5-OH-Ura), 5-hidroksi-6-hidrourasil ve 5,6-dihidroksiurasil gibi DNA ürünleri oluşmalarını sağlar (Evans ve ark. 2004, Dizdaroglu 2012). DNA'nın şeker kısmına hasar ve diğer hasar türleri Dizdaroglu (2012) tarafından açıklanmaktadır. Farklı DNA oksidatif baz hasar ürünleri Şekil 2.1.4.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.4.2.** Oksidasyon yoluyla üretilen DNA hasar ürünlerinin yapıları (Dizdaroglu 2012'dan değiştirilerek alınmıştır)

### 2.1.5. DNA oksidatif hasarının onarım yöntemleri

Oksidasyon nedeniyle oluşan DNA hasarı genetik kararsızlığa neden olabilir. Ayrıca bu genetik kararsızlığı, DNA replikasyonu, DNA onarımı, apoptoz, hücre döngüsü düzenlenmesi ve kromozom stabilitesinde yer alan proteinleri etkileyip kansere neden olmaktadır (Beckman ve Loeb 2005, Dizdaroglu 2012). DNA lezyonlarının onarılamaması, mutajenez, hücrel zehirlenme, hücre ölümü ve buna bağlı olarak karsinogenez gibi hastalık süreçlerine yol açabilir. Genetik düzeyinde, lezyon replikasyondan önce onarılamazsa, DNA sentezini engelleyerek ya da DNA polimerazlarına direnip vazgeçilerek replikasyonla etkileşime

girebilir. Replikasyonu engelleyen lezyon ölümcül bir lezyondur ve hücre ölümüne neden olabilir, diğer açıdan; sağlam bir baz ile DNA polimerazları tarafından vazgeçilen lezyonlar mutasyona neden olmaktadır (Dizdaroglu 2012). Oksidasyon nedeniyle oluşan DNA lezyonlarını onarmak için baz-kesip çıkarma onarımı (BER) ve nükleotid-kesme onarımı (NER) adı altında iki ana mekanizma mevcuttur. Genetik kararsızlığa katkıda bulunan iki yöntem daha vardır, bunlar uyuşmazlık onarımı (MMR) ve nükleotid havuzu onarımıdır. BER'de, bir DNA glikosilaz, N-glikosidik bağına hidrolize edip abazik bir bölge (AP bölgesi) üreterek DNA lezyonunu giderir (Dizdaroglu 2012); NER ise hacimli DNA bozucu lezyonların DNA'dan çıkarılmasından sorumludur (Friedberg 2001). MMR, 8-OH-Gua.Ade uyuşmazlığı gibi uyuşmazlıkların onarımına katılır (Dizdaroglu 2012). Modifiye edilmiş 2'-deoksiniüksosid trifosfatlar DNA polimerazları tarafından DNA'ya sokulmadan önce onları onarmak için Nükleotid havuzu onarımı mekanizmasında bulunur, o modifiye edilmiş moleküller mutasyonlara yol açabilirler (Maki ve Sekiguchi 1992).

Ayrıca, oksidasyon tarafından indüklenen hasar DNA'da tek- ve çift-iplikçik kırıklarına neden olup genetik kararsızlığa ve zararlı biyolojik sonuçlara yol açar. Tek-iplikçik kırıkları BER'de yer alan benzer mekanizmalarla onarılırken, çift-iplikçik kırıklarının onarımı genelde homolog rekombinasyon (HR) veya homolog olmayan son birleştirme (NHEJ) mekanizmaları ile gerçekleşir (Dizdaroglu 2012).

### **2.1.6. Oksidatif strese bağı hastalıklar**

Farklı ROS türleri arasında ortak bir özellik proteinlere, DNA ve lipidlerde oksidatif hasara yol açma kapasitesidir. ROS'un doğasına bağı olarak, bazıları çok zehirlidir ve bu sebeple çeşitli hücreselel enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar ile zehirin etkisi giderilir. Diğer koşullar altında, insan vücudu patojen ve programlanmış hücre ölümüne karşı savunma dahil olmak üzere bazı fizyolojik işlemleri kontrol etme amacıyla biyolojik işaretler olarak ROS üretir. Literatürde net raporlar, dokunun ve hücreselel bileşenlerin oksidatif hasarının birçok farklı insan hastalıkları ve yaşlanma süreçlerinde birincil veya ikincil nedensel faktör olabileceklerini bildirmiştir (Islam ve Shekhar 2015).

Çeşitli oksidanlar tarafından üretilen ROS, hücre zarlarında bulunan lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu oluşturur. Sonuçta; lipid peroksidasyonu, bir takım potansiyel olarak toksik lipid aldehytleri de oluşturur. Oksidatif stres kaynaklı lipid peroksidasyonunun çeşitli

inflatuar hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan mediyatörleri ürettiği bilinmektedir. Lipidden türevlenen aldehitlerin aşırı hücre çoğalması veya hücre ölümü gibi sitotoksositeye neden olacağı, ayrıca çeşitli hücrel proteinlerin ve genetik materyalin (DNA ve RNA) genotoksositeye yol açan değişikliklerine sebep olabileceğine inanılmaktadır (Yadav 2015).

Sınır dokusunun bozulumu (Nörodejeneratif) hastalıklarında, oksidatif stresin; Parkinson hastalığı, Alzhiemer hastalığı, inme, travma ve kasılma nöbetleri de dahil olmak üzere başlıca sinir dokusunun bozulumu hastalıkların patojenezinde nedensel ya da en azından yardımcı faktör olduğuna dair önemli kanıt bulunduğu bildirilmiştir (Ghadge ve ark. 1997, Singh ve ark. 2004). Parkinson hastalığından etkilenen hastaların beyindeki gri maddelerindeki DNA ve proteinlerin lipid peroksidasyonunun ve oksidasyonunun artışın kanıtları görülmüştür. Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve bazı diğer sinir dokusunun bozulumu hastalıklarında oksidatif stresin belirteçlerinde benzer artış da görülmüştür (Saggu ve ark. 1989, Singh ve ark. 2004). Şizofreninin sinir dokusunun bozulumu hastalıklarından olduğu bilinirken, oksidatif stresin şizofreniye katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Normal gönüllüler ile şizofreniden başka psikiyatrik hastalıklara sahip hastaların raporları karşılaştırıldığında, şizofreni hastalarının kanlarındaki artmış olan pentan gazı (lipid peroksidasyonu için bir belirteç) ile beraber lipid peroksidasyonunun da artmış olduğunu göstermiştir (Phillips ve ark. 1993, Singh ve ark. 2004).

Kalp ve damar hastalıkları (CVD); koroner kalp hastalığını (kalp krizi), serebrovasküler hastalığı (inme), yükseltilmiş kan basıncını (hipertansiyon), periferel arter hastalığını, romatizmal kalp hastalığını, konjenital kalp hastalığını ve kalp yetmezliğini içermektedir. Büyüyen kanıtlar, CVD gelişiminde ROS'un rolünü ve patofizyolojik koşullar altında oksidan-antioksidan yollarının düzenlenmesinin bozulduğunu göstermektedir (Rani ve Jain 2015).

Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengesizlik mutlaka karsinogeneze yol açar. Birçok rapor ROS'un oksidatif stres şeklinde karsinogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir (Kryston ve ark. 2011, Rani ve Gupta 2015). Daha önce bahsedildiği gibi (bölüm 2.1.5.), oksidasyon nedeniyle oluşan DNA hasarı genetik kararsızlığa yol açarak DNA onarımı ve programlanmış hücre ölümünü ters yönde etkileyebilir ve sonuçta karsinogeneze neden olabilir (Beckman ve Loeb 2005; Dizdaroglu 2012). Oksidatif stres yoluyla DNA hasarı, tek-veya çift-ipçiklikli DNA kırıklarını ve/veya DNA çapraz bağlarını üreterek DNA'daki pruin, pirimidin ve şeker kısımlarına zarar verir (Dizdaroglu 2012; Rani ve Gupta 2015).

Yaşlanma, oksidatif stres ve ROS arasındaki korelasyonu kanıtlayan çalışmalar tarafından hedeflenen önemli alanlardan biridir. Evans et al.'in (2004) belirttiği gibi "Harman (1956) tarafından tanımlanan yaşlanma serbest radikalının teorisi, hasar birikiminden oluşan yaşlanma ve gelişimsel olarak programlanmış yaşlanma olmak üzere iki düşünce okulundan alınmıştır". Böylece yaşlanmanın, serbest radikal hasarının biyomoleküllere kademeli olarak birikmesi sonucu meydana geldiği bildirilmiştir. Antioksidan savunmalarının hasar birikmesine ve işlev kaybına yol açabilecek potansiyel zararlı radikal türlerine karşı koyamadığı ve süpüremediği düşünülmektedir (Evans ve ark. 2004).

Ayrıca oksidatif stres, organların korunması ve nakli, obezite, şeker hastalığı, tiroid bezi hastalıkları, romatizmal artrit ve diğer inflamatuvar bozukluklarda büyük ya da küçük bir role sahiptir; diğer kaynaklarda da daha fazla hastalıkları bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2015, Rani ve Yadav 2015).

### **2.1.7. DNA hasar ürünlerinin analiz yöntemleri**

DNA hasar ürünlerinin analiz yöntemleri ROS ölçüm yöntemleri altında sınıflandırılmıştır. ROS ölçüm yöntemleri iki ana gruba ayrılmıştır; bunlar spin yakalama dahil olmak üzere doğrudan Elektron Spin Rezonans (ESR) yöntemleri ve dolaylı Parmak İzi Alma yöntemleridir. Genelde, DNA hasar ürünleri, böyle bir hasara neden olan radikal türlerinin varlığının parmak izleri olarak incelenir ve böylece hasar ürünleri analizi ROS ölçümünün parmak izi yöntemi olarak kabul edilir (Kohen ve Nyska 2002, Rani ve ark. 2015, Halliwell ve Gutteridge 2015b). ESR, serbest radikallerde olduğu gibi eşleşmemiş elektronların yakın çevresini algılamak için kullanılır. Ancak daha reaktif radikaller ölçülecek düzeye kadar toplanmadığından bu yöntemle yalnızca az reaktif olanlar saptanabilir. Böyle bir duyarlılık durumunu çözmek için ESR tarafından kolaylıkla tespit edilebilen daha az reaktif ve daha kararlı türler üretmek amacıyla yüksek reaktif ROS tuzak molekülleri ile reaksiyona sokulur ve reaksiyona spin tuzaklama denir. N-tert butil-p-fenilnitron (PBN), 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksit (DMPO), 1,1,3-trimetil-izindol N-oksit (TMINO) ve 5-tert-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin N-oksit (BMPO) ESR tuzaklarındandır (Halliwell ve Whiteman 2004, Rani ve ark. 2015). Parmak izi alma yöntemleri belirteçlerin belirlenmesini içermektedir. Buna örnek olarak süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, DNA hasarı ve proteinlerin belirteçleri ile lipitin yan ürünlerinin ölçülmesidir (Rani ve ark. 2015).



Daha önce açıklandığı gibi (bölüm 2.1.4.), DNA hasarı, DNA bazlarının ve şeker kısımlarının çeşitli değişikliklerine neden olur. DNA hasar ürünleri, HPLC, GC-MS ve tek hücre jel elektroforezi (komet) gibi çeşitli kromatografik teknikler kullanılarak analiz edilebilir (Kohen ve Nyska 2002). Ayrıca DNA hasar ürünlerinin izolasyonunun ve karakterizasyonunun kullanılabilirliği için ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, elektrokimyasal algılama ile HPLC (HPLC-ECD) ve LC-MS/MS dahil olmak üzere başka yöntemler belirtilmiştir (Jaruga ve ark. 2008). Kütle spektrometrisini içermeyen teknikler; analitler için yapısal bir kanıt oluşturamaz ve bir kerede sadece tek bir ürün ölçülebilir. Diğer açıdan, kütle spektrometrisini kullananlar nükleik asit bileşenlerinin hassas nitel ve nicel tayinleriyle yapısal kanıtları da sağlamaktadır (Jaruga ve ark. 2008).

Bu çalışmada DNA hasar ürünlerini incelemek için GC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu nedenle bu yöntemin daha detaylı bir açıklaması gerekir. DNA hasar ürünlerinin serbest bazlar ve nükleositler olarak analizi için GC-MS (elektron iyonizasyon (EI) ile MS) sunulmuştur. İzotop-seyreltme kütle spektrometresinin kullanılması, DNA lezyonlarının nicel tayininin doğruluğunu geliştirmiştir, ancak bu çalışmada kullanılmamıştır. GC-MS'in diğer avantajları, tek bir DNA örneğinde yapısal kanıtlarla dört DNA bazından birden fazla modifiye edilmiş bazları tek bir analizde ölçme kabiliyetini ve 8-OH-Guanin gibi tek DNA temsilcisini ölçümünden çıkan yanıtmanın önlenmesini içermektedir. GC-MS yöntemi DNA'dan hasar ürünlerini hidrolize ederek salıverme, türevlendirme, gaz kromatografik ayırma ve kütle spektrometrik nitel ve nicel tayin adımlarından oluşmaktadır. Serbest bazlar salıverilmek için hidrolize edici formik asit ya da E. Coli DNA tamir enzimi Fpg alternatif hidrolize edici ajan olarak kullanılabilir. DNA bazlarının ve nükleositlerinin uçucu trimetilsilil ( $\text{Me}_3\text{Si}$ ) türevlerini elde etmek için türevlendirme işleminde  $\text{Me}_3\text{Si}$  türevlendirici olarak kullanılmaktadır (Jaruga ve ark. 2008).

## **2.2. Antioksidanlar**

Yüksek antioksidan aktivitesi olan ve polifenoller içeren bitkiler uzun zaman önce Mısır'da cesetleri korunmak için kullanılmıştır (Gutteridge ve Halliwell 2010). Yeni tür antioksidanların bulunması ve değerlendirilmesine yönelik araştırmaların eğilimi önemli ölçüde artmış, bitkiler gibi doğal kaynaklar esas olarak hedef alınmıştır.

Oksijen zehirli bir elementtir ve oksijenin varlığında aerobik organizmaların hayatta kalmasının tek nedeni antioksidan savunmalara sahip olmalarıdır (Halliwell ve Gutteridge 2015a). Antioksidanlar, diğer bileşiklere karşı oluşan oksidasyon süreçlerini geciktirme, kaldırma, veya önleme yeteneğine sahip olan maddelerdir (Embuscado 2015, Halliwell ve Gutteridge 2015a). Antioksidanlar, farklı mekanizmalardan en azından birisi ile çalışır: (1) peroksidasyonu başlatan türleri süpürme, (2) metal iyonları ile şelat yapmak ve onlardan reaktif türler oluşturmamak ve lipid peroksitleri ayrıştırmamak için o iyonları etkisiz hale getirme, (3)  $\cdot\text{O}_2$ 'i söndürme ve böylece peroksit oluşumunu önleme, (4) otooksidatif zincir reaksiyonunu kırma ve/veya (5) lokalize olan  $\text{O}_2$  konsantrasyonlarını azaltma. En etkili antioksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonunu kesenlerdir (Nawar 1996, Brewer 2011).

Antioksidanların etkinliğini çeşitli faktörler etkilemektedir. Bunlar aktivasyon enerjisi, hız sabitleri, yükseltgeme-indirgeme potansiyeli, antioksidanın kaybolduğu veya yok edildiği kolaylık (uçuculuk ve ısı duyarlılığı) ve antioksidan çözünürlüğü (Nawar 1996, Brewer 2011).

### **2.2.1. Doğal ve sentetik antioksidanların oksidatif stresi azaltmadaki rolü**

Doğal antioksidanlar bitki aleminde yaygın olarak bulunur ve çoğunlukla polifenoller ve türevleri de dahil olmak üzere fenolik bileşikler olarak bilinen bir grup doğal kimyasallar ile temsil edilebilir. Bu kimyasallar, bitkiler tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünlerinden biridir ve en büyük ikincil metabolit fitokimyasal maddelerden biri olarak kabul edilir (Dai ve Mumper 2010). Genellikle tat vermek için kullanılan bitki ekstraktları çoğunlukla güçlü hidrojen verme aktivitesine sahiptir ve böylece son derece etkili antioksidanlardır. Bu antioksidan aktivite, çoğunlukla fenolik asitlerden (örn. gallik, protokatekuik, kafeik ve rosmarinik asitler), fenolik diterpenlerden (örn. karnozol, karnozik asit, rosmanol ve rosmadial), flavonoidlerden (örn. kuersetin, kateşin, naringenin ve kaempferol) ve uçucu yağlardan (örn. öjenol, karvakrol, timol ve mentol) ileri gelir (Brewer 2011).

Bitkiler doğal antioksidan kaynağıdır. En sık görülen vitaminler başlıca C ve E vitaminleri,  $\beta$ -karoten, flavonoidler, fenoller, polifenoller, fitoöstrojenler, karotenoidler, glutatyon, koenzim Q10, lipoik asit ve ayrıca selenyum, çinko, manganez gibi mineraller ve daha birçoklarıdır (Sen ve Chakraborty 2015).

Birçok sentetik fenolik antioksidan (örn. butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve propil gallat) doğal antioksidanlarla birlikte farmasötik ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır. Çünkü bu maddeler serbest radikal

oluşumunu etkili bir şekilde önler, oksidasyonu engeller ve metallerle şelat oluşturarak metallerin oksidasyona katkısını azaltırlar (Brewer 2011, Sen ve Chakraborty 2015). Gıda endüstrisinde sentetik antioksidanlar gıda muhafazası açısından büyük öneme sahiptir. Fakat sentetik antioksidanların tüketici tarafından kullanımı gitgide azalmaya başladığı görülmektedir. Bu nedenle doğal antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Sentetik antioksidanlar gibi doğal fenolik antioksidanlar etkili bir şekilde serbest radikalleri süpürebilir, UV ışığını (100-400 nm) absorbe eder ve geçiş metalleri ile şelat oluşturur. Böylece ilerleyen otooksidatif hasarı durdurabilir (Brewer 2011).

### **2.2.2. Doğal antioksidanlar olarak fenolik bileşikler**

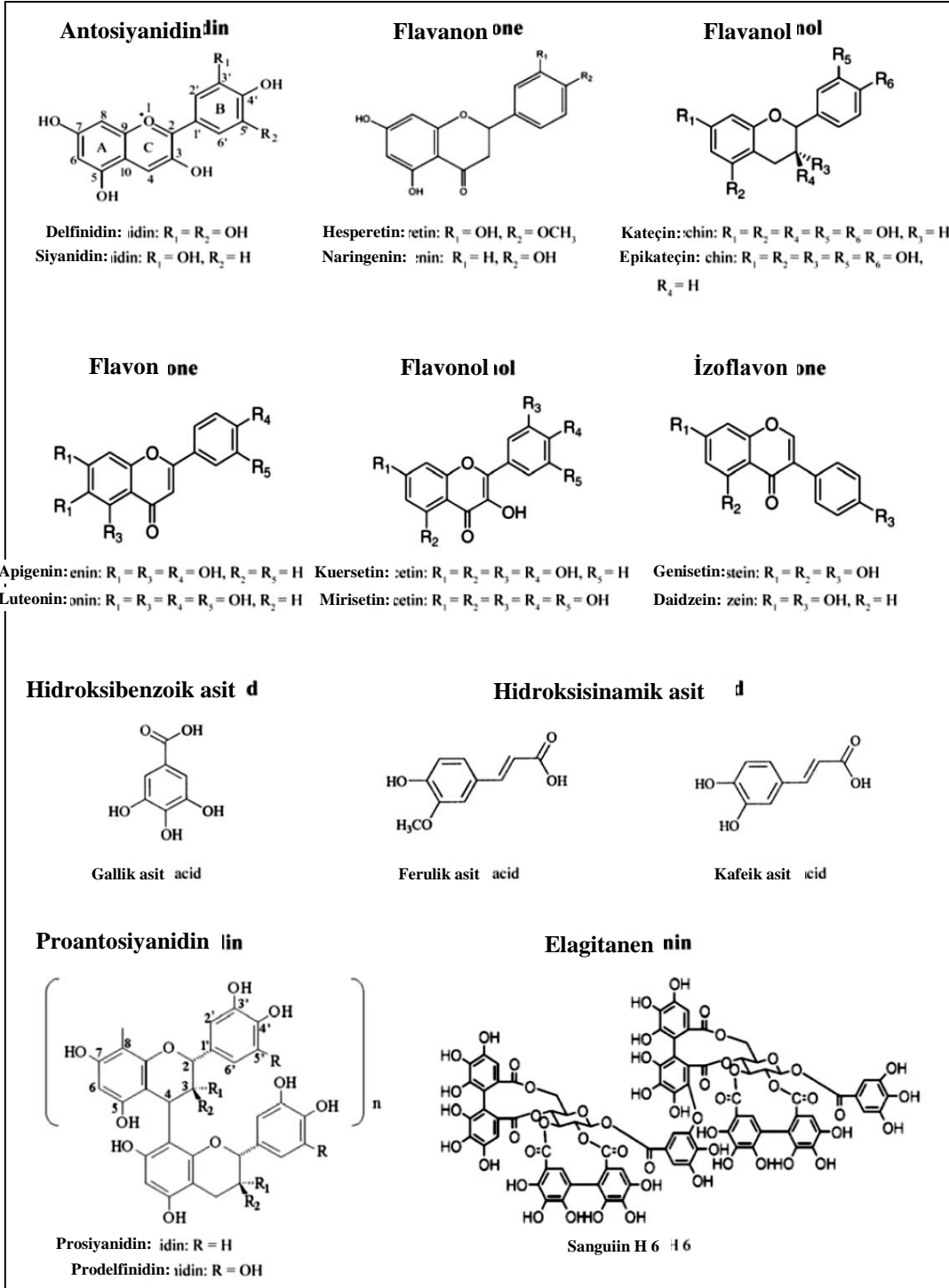
Fenolikler, bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bir veya daha fazla aromatik halkaya sahip bileşiklerdir. Onlar, fenolik asitler gibi basit moleküllerden tanenler gibi polimerize maddelere kadar uzanırlar ve şimdilik bilinen 8000'den fazla fenolik bileşik ile geniş bir şekilde bitki aleminde dağılırlar. Bitkideki fenol bileşikleri genelde ultraviyole radyasyona veya patojenler, parazitler ve predatörler tarafından saldırıya karşı savunma ve bitkilerin renk oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Dai ve Mumper 2010).

Bitkideki fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve az bulunan stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.2.2.1 ve Şekil 2.2.2.2) (D'Archivio ve ark. 2007, Dai ve Mumper 2010). Fenolik asitler, benzoik asit türevleri (örn. gallik asit) ve sinamik asit türevleri (örn. kumarik, kafeik ve ferulik asit) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bitkilerde en sık görülen fenolik asit kafeik asittir. Kafeik asit, kinik asit ile esterleştirilerek klorojenik asidi (kahvedeki ana fenol bileşiği) oluşturur. Ferulik asit de yaygın fenolik asitlerden biridir. Ferulik asit hemiselüloz esteri şeklinde tahılların hücre duvarında bulunur (Dai ve Mumper 2010).

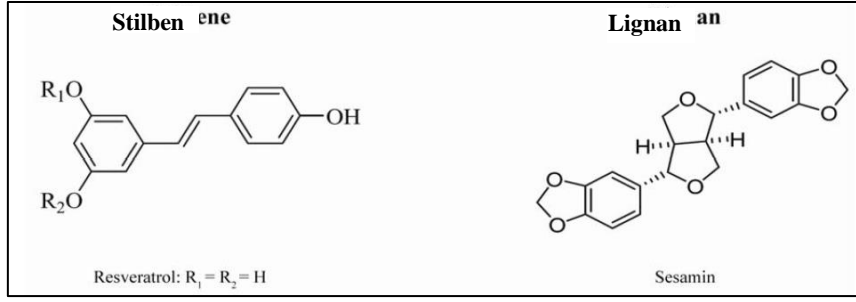
Flavonoidler gıdalardaki en bol polifenollerdir (Dai ve Mumper 2010). Flavonoidler neredeyse tamamı aynı difenil propan iskelete sahiptir. Onlar antosiyanidin yapısında görüldüğü gibi iki benzen halkası (halka A ve halka C) üç karbonlu bir zincir ile bağlanıp, difenil propan iskeletini oluştururlar. Ayrıca iki benzen halkasını bağlayan üç karbon zinciri üçüncü bir pıran halkasını (halka C) oluşturabilir (Şekil 2.2.2.1). Flavonoidler çoğunlukla

flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler ve flavanoller de dahil olmak üzere alt sınıflara ayrılmıştır. Sınıflandırma merkezi piran halkasının oksidasyon durumuna bağlıdır. D'Archivio ve ark. (2007) belirttiğine göre, bitki kaynaklarında 4000'den fazla flavonoid çeşidi bilinmektedir. Bu geniş çeşitlilik çok sayıda bulunan değiştirilebilen yapılara bağlıdır ve o değiştirilebilen yapılarında bulunan grupların (örn. hidroksil grubu) kendileri de değiştirilebilir. Farklı flavonoidlerin sınıflarının temel yapıları Şekil 2.2.2.1'de bulunmaktadır.





**Şekil 2.2.2.1.** Flavonoidler, fenolik asitler ve tanenlerin yapıları (Dai and Mumper 2010'dan değiştirilerek alınmıştır)



**Şekil 2.2.2.2.** Stilben ve lignanların yapıları (şekil Dai and Mumper 2010'dan değiştirilerek alınmıştır)

Tanenler gıdadaki polifenollerin diğer büyük bir grubudur ve hidrolize edilebilir; tanenler ve yoğunlaştırılmış tanenlere ayrılmıştır. Hidrolize edilebilir tanenlerin içerdiği glikoz veya başka bir poliol gallik asit ile esterleştirilerek gallotanenler oluşur ya da heksahidroksidifenik asit ile esterleştirilerek elagitanenler oluşabilir. Yoğunlaştırılmış tanenler ise flavan-3-ol'ün interflavan bir karbon bağ ile bağlanmış oligomerleri veya polimerleridir. Antosiyanidinlere ayrıştırılabildikleri için proantosiyanidinler olarak da adlandırılabilirler (Dai ve Mumper 2010).

Fenolik asitler genellikle serbest radikalleri tuzaklayarak antioksidan olarak çalışabilirler. Flavonoidler serbest radikalleri süpürleyebilir ve metalleri şelatlayabilir (Brewer 2011). Brewer'in (2011) açıkladığı Brown ve Kelly'nin (2007) çalışmasında fizyolojik olarak ilgili konsantrasyonlarda Cu<sup>2+</sup>'yi kullanılarak polifenoller, antosiyanidinler ve fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Onlar, ortodihidroksi değiştirebilmiş polifenollerin (siyanidin-3-glukosid, siyanidin ve protokatekuik asit) en etkili olduklarını, trihidroksi değiştirebilirmiş bileşiklerin ise (gallik asit) orta etkiye sahip olduklarını bulmuşlardır. Başka bir çalışmada, çeşitli bileşiklerin gıdadaki lipid oksidasyonunu ihibe etme kabiliyetlerine göre serbest radikal süpürme aktivitesinin sırası verilmiş ve polar bileşiklerin ferulik asit > kumarik asit > propil gallat > gallik asit > askorbik asit sırası modifiye oksijen radikal absorbanı kapasitesi yöntemine göre belirlenmiştir, polar olmayan bileşikler sırası ise 2,2-difenil-1-pikrilhidrasil yöntemi kullanılarak rosmarinik asit > butillendirilmiş hidroksitoluen ≥ tert-butilhidrokinon (TBHQ) > α-tokoferol olmuştur (Alamed ve ark. 2009).

### 2.2.3. Antioksidan kapasitesi ölçme yöntemleri

Yirmi yıl önce, daha yeni ve daha güçlü antioksidanlar bulma çabaları antioksidanların potansiyel sağlık etkileri olduğuna ilişkin bulgularla uğraşıldığından, bu bileşiklerin antioksidan kuvvetini değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir (Schaich ve ark. 2015). Çizelge 2.2.3.1 en iyi bilinen antioksidan analiz yöntemlerini özetlemektedir.

Genelde antioksidan analiz yöntemlerinden elde edilen veriler aşağıdaki şekilde ifade edilir (Schaich ve ark. 2015):

- Antioksidan kapasitesi, verilebilen toplam elektron sayısı veya antioksidanın her molü için dönüştürülmesi hedeflenen molekül sayısı (örn. fenolik-OH gruplarının sayısı ya da OH grubu başına iki elektron) olarak tanımlanabilir.
- Antioksidan aktivitesi, belirli bir hız veya reaksiyon derecesini sağlamak için gereken antioksidan konsantrasyonu olarak tanımlanır.
- Antioksidan potansiyeli, bir antioksidanın belirli bir koşullar altında radikalleri söndürme beklentisini tanımlar.

Ne yazık ki, böyle in vitro analiz yöntemleri bir pro-oksidan tarafından biyolojik olmayan radikallerin oluşumuna ve bu radikallerin bir antioksidan tarafından tuzaklanmasına bağlıdır; böylece, bu yöntemler biyolojik olarak ilgisiz hale getirilir (Gerald 1993, Gutteridge ve Halliwell 2010). Fizyolojik etkileri belirtmek için bu yöntemden sonuçlanan bilgileri kullanmak nadiren mümkündür (Halliwell ve ark. 2005, Kelly ve ark. 2008). Bitki ve doğal kaynakların numunelerinin kimyasal karmaşıklığı, sebze matrisinden antioksidanların ayrılması ve miktarının belirlenmesi de zorluk çıkarır. Bu nedenle bu yöntemler toplam antioksidan aktivite seviyesinin ölçülmesine kullanılır (Apak ve ark. 2004).

**Çizelge 2.2.3.1.** Antioksidan kapasitesini değerlendirmek için sıkça kullanılan yöntemler (Çizelgedeki kısaltma ve açıklama Embuscado 2015 ve Li and Pratt 2015'den değiştirilerek alınmıştır)

Kısaltma	Açıklama	Mekanizması ve Görevi
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil <sup>a</sup>	Bu yöntemde, beklenen antioksidan aktiviteye

	yöntemi	sahip bileşikler ya da ekstraktlar kararlı bir radikal DPPH• ile reaksiyona girmesine izin verilir. DPPH• indirgenmesinden sonra karakteristik bir dalga boyundaki absorbansta azalma reaksiyon boyunca takip edilir. DPPH• 515 nm'de absorpsiyon yapar ve ancak indirgendiğinde absorban değeri kaybolur (Brand-Williams ve ark. 1995).
FRAP	Fe (III) İyonu İndirgeyici antioksidan gücü yöntemi	Bu tahlil antioksidan gücünü değerlendirmek için Benzie and Strain (1996) tarafından sunulmuştur. FRAP testi, düşük pH'da demir (III)'den demir (II)'e indirgenerek renkli bir demir-tripiridilriazin kompleksi oluşmasına dayanır. Analizin sonuçları, belli konsantrasyonlarda demir (II) iyonları içeren çözeltilerin 593 nm'deki absorbanı ile numune çözeltisinin absorbanının değişikliklerini karşılaştırarak elde edilir.
CHROMAC	Cr (VI) İndirgen Antioksidan Kapasite yöntemi	Işık ve ark. (2013)'a göre, CHROMAC elektron-aktarmaya dayanan testlerden biridir. Bu yöntemde, n-elektron indirgen antioksidan ile aşırı miktarda Cr(VI) reaksiyona girerek fenoksi radikali oluşturulur ve geri kalan Cr(VI) çok renkli $[Cr^{III}(HL)_2]^+$ şelat kompleksine indirgenerek 540 nm'de maksimum absorbanı gösterir.
TPC	Toplam Fenol İçeriği	Çeşitli yöntemler ile bir numunede bulunan Toplam Fenol İçeriği (TFC)'in belirlenmesi için kullanılacak en iyi bilinen Folin-Ciocalteu yöntemidir (bölüm 3.3.'de bulunmaktadır)

<sup>a</sup>: ilgili antioksidan(lar)'ın değerlendirilmesi için belirtilen bileşikler ile reaksiyona girmelidir

**Çizelge 2.2.3.1.** Antioksidan kapasitesini değerlendirmek için sıkça kullanılan yöntemler (Çizelgedeki kısaltma ve tes adı Embuscado (2015) ve Li and Pratt (2015)'den değiştirilerek alınmıştır) (devam)

Kısaltma	Açıklama	Mekanizması ve Görevi
ORAC	Oksijen Radikali Absorbans Kapasite yöntemi	Bu yöntem Cao ve ark. (1993) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde β-fikoeritrin (β-PE) bir protein göstergesi olarak kullanılır ve



---

		peroksil radikalleri tarafından yükseltgenir. Peroksil radikalleri 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) tarafından oluşturulur. Ayrıca, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks, bir E vitamini analogu) bir kontrol standart olarak kullanılır. Bu yöntem, peroksil radikali tarafından oluşan oksidasyondan $\beta$ -PE korumak için bir antioksidan yeteneğini ölçer.
TEAC/ABTS	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite yöntemi / 2,2'-azo-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonik acit) <sup>a</sup>	Re ve ark. (1999) tarafından tarif edildiği gibi, bu yöntemde, ABTS potasium persulfat ile yükseltgenerek 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS <sup>•+</sup> ) (A734 $\approx$ 0,700 $\pm$ 0,020) radikal monokasyonu oluşturulur, ondan sonra ABTS <sup>•+</sup> hidrojen-verici antioksidan tarafından indirgenerek renk azalması olur ve absorbans ölçülerek belirlenir. Sonuçlar ise Troloks mikromolleri eşdeğeri ile ifade edilir.
CUPRAC	Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan kapasite yöntemi	Cu <sup>2+</sup> redoks kimyasının Fe <sup>3+</sup> kimyasından daha hızlı kinetiklere sahip olduğu için bu yöntemin FRAP'dan daha avantajlı olduğunu söylenmiştir (Apak ve ark. 2004). Bu yöntem bakır(II)-neokuproin'in [Cu(II)-NC] kromojenik yükseltgen olarak kullanılmasına dayanır. Yükseltgen çözeltisi ile antioksidan çözeltisini karıştırdıktan sonra oksidasyon reaksiyonu tamamına zorlanır ve 450 nm'deki absorbans gelişimi ölçülür.

---

<sup>a</sup>: ilgili antioksidan(lar)'ın değerlendirilmesi için belirtilen bileşikler ile reaksiyona girmelidir

## 2.3. *Vitis vinifera* (Asma)

### 2.3.1. Sınıflandırma ve genel bilgiler

Bu çalışmada *Vitis vinifera* (asma) bitkisinin sürgün kısımları toplanıp, ekstrakte edilmiş, kimyasal bileşimi ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Üzüm ağacının bilimsel sınıflandırılması Çizelge 2.3.1.1'de açıklanmaktadır.

Asma dünyanın çeşitli bölgelerinde yetiştirilmektedir. Dünyada 8000 asma çeşidi vardır. Asma, yalnız başına bırakıldığında 15 metre ve hatta daha fazla uzayabilen çok yıllık bir bitkidir. Ana üzüm üretici ülkeler İspanya, Arjantin, Ermenistan, Avustralya, Şili, Fransa, İran, İtalya, Portekiz, Romanya, Türkiye ve Amerika'dır (<http://www.fruitvs.com/en/grape-facts/model-22-7>, 2016). Türkiye'deki en önemli tipler Alfons (bu çalışmada kullanılan tipidir), Sultani Çekirdeksiz, Çavuş, Ada Karası, Ak Üzüm, Bornova Misketi, Hamburg Misketi, Horoz Karası, Müşküle, Misket, Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karasıdır (ÇELİK 1998; Anonim 2009).

**Çizelge 2.3.1.1.** Asma ağaçlarının bilimsel sınıflandırılması (<http://www.fruitvs.com/en/scientific-classification-of-grape/model-22-5>, 2016)

<b>Alan</b>	Eukarya
<b>Alem</b>	Plantae
<b>Alt-Alem</b>	Tracheobionta
<b>Bölüm</b>	Mangoliophyta
<b>Sınıf</b>	Mangoliopsida
<b>Alt-Sınıf</b>	Rosidae
<b>Sıra</b>	Vitales
<b>Aile</b>	Vitaceae
<b>Cins</b>	Vitis
<b>Tür</b>	Vitis vinifera
<b>Genel Grubu</b>	Grape

### 2.3.2. *Vitis vinifera*'nın farklı kısımlarında bulunan kimyasal bileşenler

Genellikle, asmanın en iyi tüketilen kısmı meyve kısmıdır. Sousa ve ark. (2014) *V. vinifera* (Benitaka çeşidi)'in diyet lifleri, karbonhidratlar, proteinler, lipidler, C vitamini, antosiyaninler, demir, potasyum, çinko, kalsiyum ve mangan içerdiğini bildirmiştir. Kateşinler, epikateşinler, prosiyanidinler, proantosiyandinler, resveratrol ve diğer stilbenler gibi polifenoller çekirdeklerde, üzüm dış kapağında ve yapraklarda bildirilmiştir (Fraternale ve ark. 2011, Fraternal ve ark. 2016). Farklı literatürlerden elde edilen diğer bilgiler *V. vinifera*'nın yapraklarında polifenolik (antosiyaninler, löko-antosiyaninler), flavonoidler

(rutin, kuersitrin, izokuersitrosid, kaempferol, luteolol), gallik tanenler ve kateşinler bulunduğunu göstermiştir; ayrıca meyveler glikoz ve organik asitler (tartarik, malik, süksinik, sitrik ve oksalik asitler) içermektedir (<http://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/herbs-medicinal-plants/grape-benefits/>, 2016).

*V. vinifera*'nın farklı türlerinin gövdelerinde flavonoidler dahil olmak üzere polifenolik bileşiklerinin bulunduğu bildirilmiştir (Domínguez-Perles ve ark. 2014). Tanenler, polifenoller, flavonoidler ve organik asitlerin *V. vinifera* L. (tür: Sangiovese) sürgünlerinde oldukları bildirilmiştir (Fraternale ve ark. 2016).

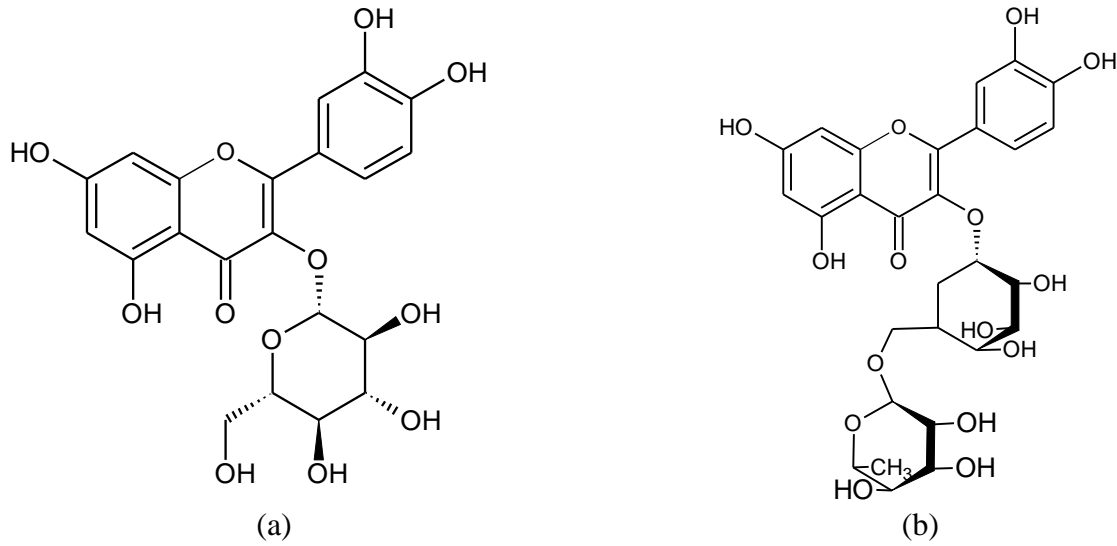
### 2.3.3. *Vitis vinifera* (alfons) sürgünleri

*V. vinifera*, dallarını bir destek üzerine tırmanıp dağıtmak için sürgünlerini kullanan çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.3.3.1). Sürgünler, çoğalan hücreler içeren büyüme bölgeleri yan meristemler adlandırılan kısımlardan kaynaklanır (Fraternale ve ark. 2016). Çiçek açan bir uyarıcı meydana gelirse ve buna göre yan meristem ya sürgün (tırmanma) ya da çiçeklenme (üreme) organı olarak gelişebilir. Bu nedenle çiçeklenme sürgünler yerine aynı meristemlerden ortaya çıkabilir (Calonje ve ark. 2004). Sürgünler, asma dallarının uzatılmasından ve dağıtılmasından sorumlu olarak dalların güneş ışığına erişmesini sağlar (Keller 2015), böylece daha aktif fotosenteze izin verir.



**Şekil 2.3.3.1.** *Vitis vinifera* (a) normal sürgünler ve (b) destekleyici bir telin üzerini saran sürgünler (Keller 2015'den alınmıştır)

Fraternale ve ark. (2016) *V. vinifera* L (tür: Sangiovese) sürgünlerinde farklı fenolik asitler ve flavonoidlerin bulduklarını bildirmiştir. Bu çalışmada Bursa, Türkiye Nilüfer köyünde yetiştirilen *V. vinifera* (tür: alfons) sürgünleri incelenmiştir. *V. vinifera* (alfons) hidroalkolik ekstraktında en az üç fitokimyasal bulunmuştur. Bunlar izokuersitrin, rutin ve klorojenik asit (bölüm 4). Rutin ve izokuersitrin (Şekil 2.3.3.2) DNA oksidasyonuna karşı antioksidan profili henüz bilinmezken antioksidan oldukları bilinmektedir.



**Şekil 2.3.3.2.** (a) Rutin ve (b) izokuersitrinin kimyasal yapıları

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma	Numara
Asetonitril	Merck	100030
Metanol	Merck	106007
Formik asit	Merck	100263
Trimetilklorosilan	Merck	102333
Sodium dihidrojen fosfat	Panreac	141677
Fosforik asit	Merck	100563

Piridin	Sigma-Aldrich	270970
Demir (II) sulfat-7-hidrat	Riedel-de Haen	12354
Potassium dikromat	Sigma-Aldrich	209244
1,5-difenilkarbazit	Merck	64271
Folin-Ciocalteu ajanı	Sigma-Aldrich	F9252
Gallik asit	Sigma-Aldrich	G7384
Etanol	Sigma-Aldrich	34870
Klorojenik asit	Acros organics	1002400
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich	16911
N,O-bis(trimetilsilyl)trifluoroasetamid	Aldrich	15222
5-(hidroksimetil)urasil	Sigma-Aldrich	852589
4,6-diamino-5-nitropirimidin	Sigma-Aldrich	S454605
Alloksan	Titan Biotech	2244113
4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin	Santa Cruz	217034

**Çizelge 3.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar (devam)**

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Firma</b>	<b>Numara</b>
5,6-Dihidroksi metil urasil	Sigma-Aldrich	D7628
8-hidroksi-2'-deoksiganosin	Sigma-Aldrich	H5653
Deoksiribonükleik asit (Buzağı timüs)	Sigma-Aldrich	D4522
İzokuersitrin (Kuersetin 3β-D-glu	Sigma-Aldrich	17793
Rutin	Sigma-Aldrich	R5143
5-Formilurasil	IS Chemical Technology	1195080
5-(hidroksimetil)sitosin	Toronto Research Chemicals	H945870
5-hidroksihidantoin	Toronto Research Chemicals	H943000
5,6-dihidrotimin	Toronto Research Chemicals	D449440
2,8-dihidroksiadenin	Toronto Research Chemicals	D45105
5-hidroksi-5-metilhidantoin	Toronto Research Chemicals	H947500
2-hidroksi adenin	Toronto Research Chemicals	I819000
5-Hidroksiurasil	NIST <sup>a</sup>	-
5-Hidroksisitosin	NIST <sup>a</sup>	-

Timin glikol	NIST <sup>a</sup>	-
8-Hidroksiadenin	NIST <sup>a</sup>	-
2,6-diamino-4-hidroksi-5-Formamidopirimidin	NIST <sup>a</sup>	-
NaOH	Riedel-de Haen	S181200
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	13418
NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	217255
CuSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	12849

<sup>a</sup>: National Institute of Standards & Technology (ABD) tarafından hibe olarak temin edilmiştir

### 3.1.2. Çözeltiler

Klorojenik asit, rutin ve izokuersitrin standart çözeltileri: Her birinin stok çözeltisi metanol kullanılarak 1000 mg/L konsantrasyonda hazırlanmıştır. Gereken seyreltmeler metanol ile yapılmıştır.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi: 205 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9795 µL saf su ile karıştırılarak 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elde edilmiştir. 200 mM çözeltisinden 1250 µL 25 mL'lik balon jöjeye alınıp saf su ile tamamlanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır.

FeSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>) çözeltisi: 0,139 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tartılıp 50 mL'ye saf su ile tamamlanarak 10 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır.

Folin-Ciocalteau çözeltisi: 5 mL Folin-Ciocalteau ajanı 10 mL saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Lowry A çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> az bir miktar suda çözülerek ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Lowry B çözeltisi: 1 g NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> ve 0,5 g CuSO<sub>4</sub> az miktar suda çözülerek ve sonra 100 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Lowry C çözeltisi: 50 mL Lowry A çözeltisi ile 1 mL Lowry B çözeltisi karıştırılarak hazırlanır.

Fosfat tamponu (pH = 2,8): 6,24 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  az suda çözülerek ve 0,68 mL %85  $\text{H}_3\text{PO}_4$  eklenerek ve sonunda saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

$3,4 \times 10^{-4}$  M  $\text{Cr}^{6+}$  çözeltisi: 0,005 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  tartılıp hacmi pH 2,8 tamponu ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

$3,4 \times 10^{-4}$  M 1,5-Difenilkarbazit (1,5-DFK) çözeltisi: 0,1 g 1,5-DFK + 70 mL aseton ve bu karışım 100 mL'ye fosfat tampon çözeltisi ile tamamlanmış, bundan 20,63 mL alınıp fosfat tampon çözeltisi ile 250 mL'ye seyreltilmiştir.

0,1 M sitrik asit çözeltisi: 1,0507 g sitrik asit tartılıp 10 mL 0,1 N NaOH ilave edilerek hacmi su ile balon jode 50 mL'ye tamamlanmıştır.

6 M HCl çözeltisi: 6,44 mL %35 HCl'den alıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

pH 1,2 tamponu çözeltisi: 1,45 mL 0,1 M sitrik asit ve 8,55 mL 6 M HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

DNA çözeltisi: Buzağı timüs'tan DNA kullanıma hazır bir şekilde satın alınmıştır. 5 mg DNA 10 mL ultra-saf suda çözülmüş ve bir gece 4°C'de bekletilmiştir (Jaruga ve ark. 2008). Sonraki gün, DNA çözeltisi 1:10 oranı ile ultra-saf su kullanılarak seyreltilmiş, 4°C'de bir gece daha bekletilmiş ve 280 nm'de DNA absorbansı okunmuştur.

### 3.1.3. Örnek Hazırlama

Bitki numunesi Nilüfer köyünden (Bursa, Türkiye) Mayıs, 2016'da toplanmıştır. *V. vinifera* (alfons) sürgünleri (Şekil 3.1.3.1) ekstraksiyonuna uyumlu olması için blender kullanılarak parçalanmıştır. Parçalanmış olan sürgünlerin üzerine (10,0688 g) 50 mL etanol : su (20 : 80) (v/v) eklenerek ultrasonik banyoda 60°C'de 120 dakika ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonun ardından ekstrakte edilen numune süzölmüş ve analiz edilmiş, kalıntısı ise atılmıştır.





**Şekil 3.1.3.1.** *V. vinifera* (alfons) sürgünleri (a) parçalamadan önce ve (b) parçalandıktan sonra

### 3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar

#### 3.1.4.1. Aletler

Çalışmada (a) kullanılan aletler Çizelge 3.1.4.1 (b) sterilize edilmiştir.

**Çizelge 3.1.4.1.1.** Çalışmada kullanılan aletler

Alet	Marka	Model
Terazi	Mettler Toledo	MS105DU
Döner buharlaştırıcı	BIBBY	RE 100
Etüv	VWR	Dry-line
İnkübatör	Memmert	INB 400
Liyofilizatör	Labconco	Freezone 2.5 Plus
Manyetik karıştırıcı	Wisd	MS-MP8
Mikropipet (500-5000 µL)	Eppendorf	Research
Mikropipet (100-1000 µL)	Eppendorf	Research
Mikropipet (10-100 µL)	Eppendorf	Research
pH-metre	Hanna	HS221

Santrifüj	Hermle	Z 206 A
Saf su cihazı	Elga Purelab	Option Q DV25
Ultrasonik banyo	United	2.8 L
Vorteks karıştırıcı	Wisd	VM-10

### 3.1.4.2. Ultraviyole-görünür (UV/VIS) spektrofotometre

Tek ışın yollu Varian Cary-50 UV/VIS (Melbourne, Avustralya) cihazı toplam fenol içeriği, antioksidan kapasitesi ve DNA konsantrasyonu tayini için kullanılmıştır. Kuartz küvet ile ölçümler yapılmıştır.

### 3.1.4.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi

Vakum degazör, ikili pompa, otomatik örnekleyici ve diyod-serili dedektörü içeren bir Agilent 1200 HPLC sistemi (Waldbronn, Almanya) ve XBridge C18 (4,6 x 250 mm, 3,5 µm) kolon Waters (İrlanda)'dan kullanılmıştır.

### 3.1.4.4. Gaz kromatografi – kütle spektrometre / kütle spektrometre

DNA oksidatif hasar ürünleri tayini için otomatik örnekleyici içeren Trace 1300 (Gaz Kromatograf) TSQ 8000 Evo (Triple Quadrupole Mass Spektrometre) Thermo Scientific (ABD)'den bir Gaz kromatografi – kütle spektrometre / kütle spektrometre ile kullanılmıştır. Agilent Durabond DB-5MS kolon (12 m uzunluğu, 0,20 mm çapı (narrow bore) ve 0,33 µm film) kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

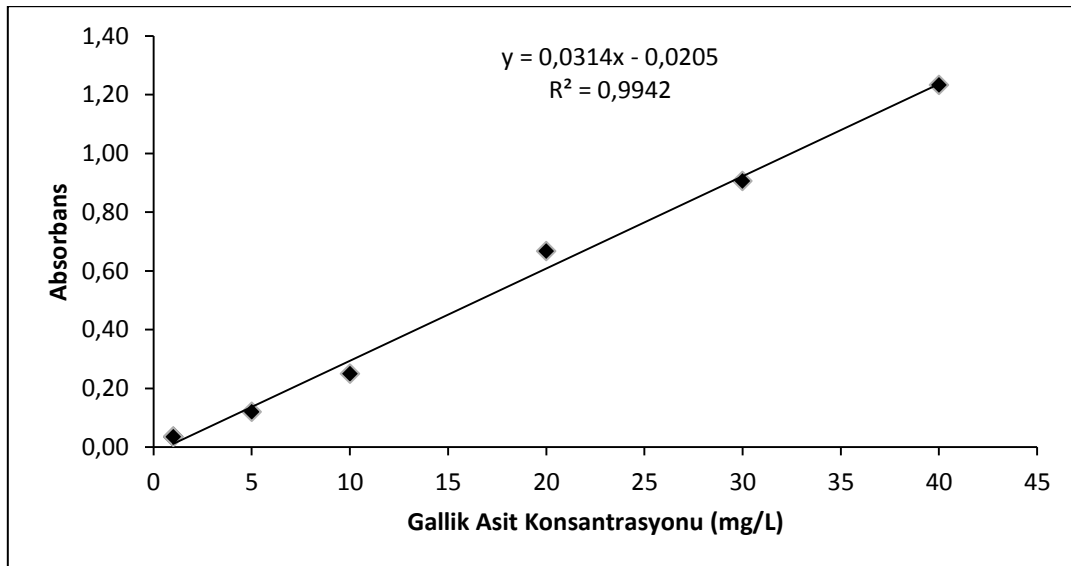
### 3.2.1. Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi

#### 3.2.1.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon grafiği hazırlama

Gallik asit (GA) standart madde olarak kullanılmıştır. Metanol çözücü kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (Çizelge 3.2.1.1.1) gallik asit çözeltileri hazırlanmış ve FC yöntemi uygulanarak kalibrasyon grafiği (Şekil 3.2.1.1.1) çizmek için Microsoft Excel® 2010 kullanılmıştır. GA konsantrasyon eşdeğerlerine (mg/L) karşı her bir numune için okunan üç absorbans ortalaması kalibrasyon grafiğinin temel değişkenleridir.

Çizelge 3.2.1.1.1. Gallik asit konsantrasyon değerleri ve absorbansları

GA Konsantrasyonu (mg/L)	Absorbans
1	0,0349
5	0,1191
10	0,2490
20	0,6669
30	0,9054
40	1,2316



Şekil 3.2.1.1.1. Folin-Ciocalteu yöntemi için kalibrasyon grafiği

### 3.2.1.2. *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının toplam fenol içeriği

Folin-Ciocalteu yönteminde (Şahin ve ark. 2013) kullanılan stok çözeltilerinin (Lowry A, Lowry B, Lowry C) hepsi taze hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler Varian Cary-50 UV/VIS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FC yöntemi 100 µL asma sürgünlerinin ekstraktını tüpe koyarak başlar, 1900 µL saf su ve 2500 µL Lowry C çözeltisi eklenmiş ve iyice karıştırılmış, bundan sonra 250 µL FC çözeltisi önceki karışıma eklenip karıştırılmış, bu karışım karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra UV/VIS  $\lambda_{\max} = 750$  nm'de absorpsiyonu okunmuştur.  $y = mx + b$  olan kalibrasyon denklemi kullanılarak numunelerin FC sonuçları Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) olarak elde edilmiştir.

### 3.2.2. CHROMAC antioksidan kapasite yöntemi

Bu çalışmada, antioksidan kapasitesini belirlemek için patentli yeni bir yöntem kullanılmıştır (Şahin ve Demir 2013) (Patent No. TPE-2013/06324). Bu çalışmanın yapıldığı CHROMAC yöntemi de aynı laboratuvarında icat edilmiş ve onaylanmıştır. CHROMAC sonuçları ABTS ve CUPRAC yöntemlerinin sonuçlarıyla karşılaştırılabilir. Bu yöntemin fenolik asitler, flavonoidler ve sentetik antioksidanlara duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Işık ve ark. 2013).

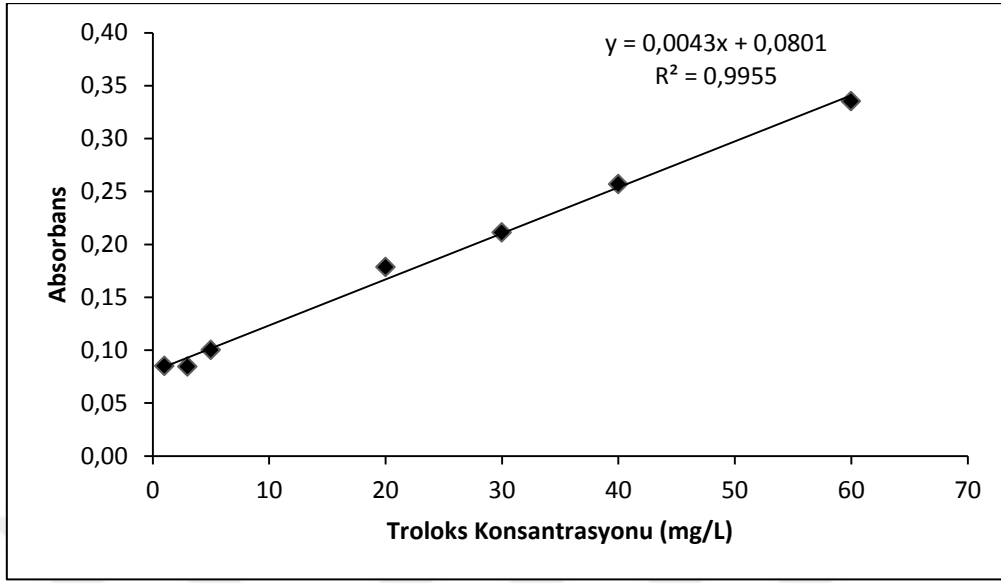
#### 3.2.2.1. CHROMAC yöntemi için kalibrasyon grafiği hazırlama

Kalibrasyon grafiği hazırlamak için troloks standart madde olarak metanol ile hazırlanmıştır. Hazırlanan troloks konsantrasyonları (mg/L) 540 nm'de okunmuştur ve her bir konsantrasyon için üç ölçüm yapılmıştır (Çizelge 3.2.2.1.1 ve Şekil 3.2.2.1.1). pH 1,2 olan tampon çözelti kullanılarak blank (kör) örnek hazırlanmıştır. Troloks konsantrasyonlarına karşı blank numunesi ile örneğin absorbansının farkı (blank absorbansı – örnek absorbansı) kalibrasyon grafiğinde kullanılan değişkenlerdir.

Çizelge 3.2.2.1.1. Troloks konsantrasyon değerleri ve absorbansları

Troloks Konsantrasyonu (mg/L)	$A_{\text{blank}} - A_{\text{örnek}}$
1	0,0850
3	0,0845
5	0,1003
20	0,1785
30	0,2112
40	0,2568
60	0,3353

Absorbans:  $A_{\text{blank}} - A_{\text{örnek}}$



Şekil 3.2.2.1.1. CHROMAC için kalibrasyon grafiği

### 3.2.2.2. *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının antioksidan kapasitesi

Işık ve ark. (2013) tarafından geliştirilen CHROMAC yöntemi kullanılmıştır. Varian Cary-50 UV/VIS spektrofotometer  $\lambda_{\text{max}} = 540$  nm ölçümler için kullanılmıştır. 3500  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu, 400  $\mu\text{L}$  su ve 500  $\mu\text{L}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  çözeltileri 100  $\mu\text{L}$  bitki ekstrakt örneğine eklenip karıştırılmış ve 1 dakika bekletilmiş, sonunda 500  $\mu\text{L}$  1,5-DFK çözeltisi karışıma eklenip karıştırılmış ve karanlıkta 50 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometre'yi sıfırlamak için saf su kullanılmış ve bundan sonra absorbans ölçülmüştür.

### 3.2.3. *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) analizi

Agilent 1200 HPLC sistemi *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktı analizi için kullanılmıştır. İkili gradient (kademeli artış) hareketli faz olarak (A) %1 suda formik asit ve (B) asetonitril kullanılmış; gradient olarak %10 B (0 dakikada), %13 B (10. dakikada), %41,5 B (20. dakikada), %70 B (25. dakikada) ve %10 B (35. dakikada) kullanılmıştır (Çizelge 3.2.3.1). 10  $\mu\text{L}$  örnek hacmi, 0,5 mL/dakika akış hızı ve XBridge C18 (4,6 x 250 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) kolon Waters (İrlanda)'dan kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2.3.1. HPLC-DAD çalışma koşulları**

Zaman (dk)	Hareketli faz (%)	
	%1 Formik asit - Su	Asetonitril
0	90	10
10	87	13
20	58,5	41,5
25	30	70
35	90	10
38	90	10

### **3.2.3.1. *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının nitel analizi**

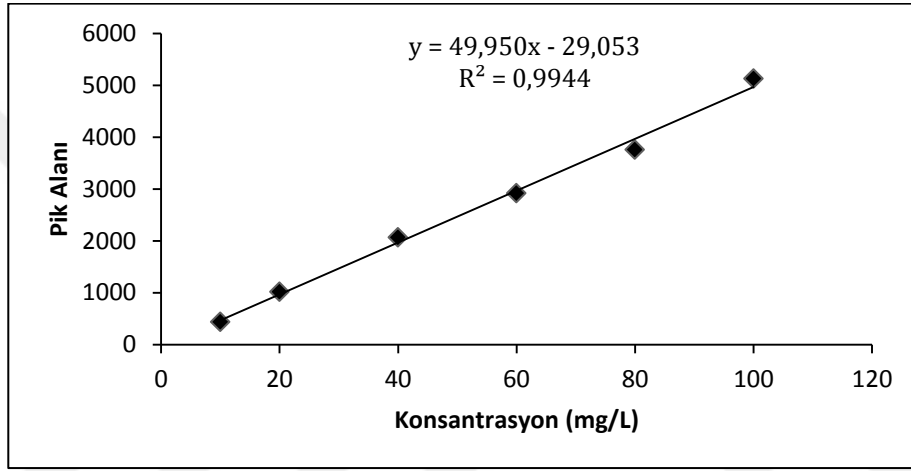
Öncelikle, kaç tane bileşiğin ekstraktta bulunabileceğini bulmak için bir başlangıç HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu başlangıç analizi *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktında en azından üç bileşiğin bulunduğunu göstermiştir. Üç kalibrasyon grafiği hazırlayarak ekstrakttaki bulunan üç bileşiğin miktarları belirlenmiştir. Bölüm 3.2.'deki açıklanan yöntem ile ekstrakte edilen numune 1:4 oranı ile seyreltilerek HPLC-DAD analizi için kullanılmıştır.

### **3.2.3.2. Nicel analiz için kalibrasyon grafiği**

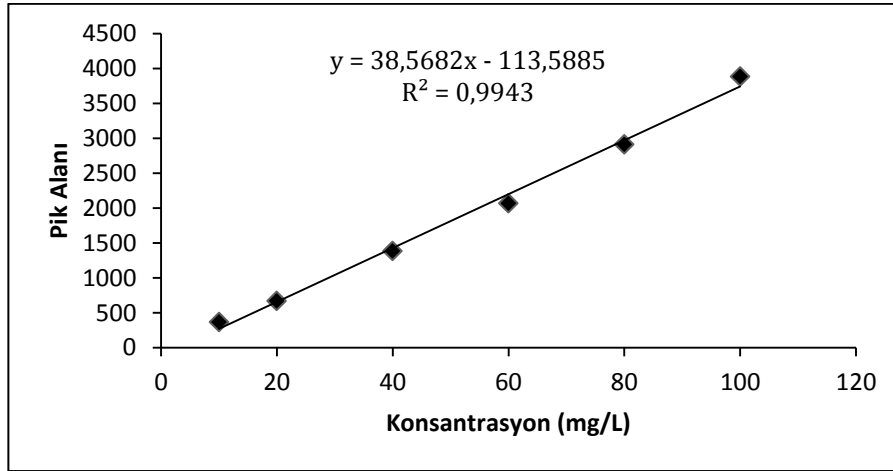
Klorojenik asit, rutin ve izokuersitrin için üç kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.3.2.1 ve Şekiller 3.2.3.2.1, 3.2.3.2.2 ve 3.2.3.2.3). Metanol standart fenolik maddeler için çözücü olarak kullanılmıştır.

### **Çizelge 3.2.3.2.1. HPLC nicel analizi için kalibrasyon grafiği değerleri**

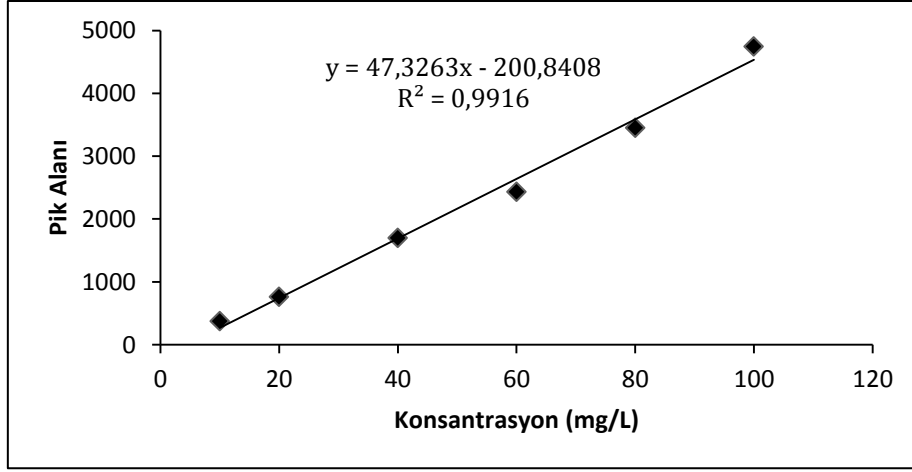
Konsantrasyon (mg/L)	Pik Alanı		
	Klorojenik asit	Rutin	İzokuersitrin
10	434,3	367	374
20	1017,2	668	762,9
40	2066,7	1382,8	1697
60	2914	2067,6	2434,6
80	3755,4	2908,7	3453,2
100	5122,7	3880,5	4744,4



Şekil 3.2.3.2.1. Klorojenik asidin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2.3.2.2. Rutinin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2.3.2.3. İzokuersitrinin HPLC analizi için kalibrasyon grafiği

### 3.2.4. Antioksidanların DNA oksidatif stresine etkileri

Gereken oksidatif stres ortamı Fenton reaksiyonu kullanılarak oluşturulmuştur (Oliveira ve ark. 2006).  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$ , rutin ve izokuersitrin stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Bitki ekstraktı dahil olmak üzere hazırlanan numunelerin hepsini aynı şartlar altında tutmak ve aynı konsantrasyonlarda aynı içeriği içerecek şekilde hazırlamak için 20 mL *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktı döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) kullanılarak vakum altında 40°C'de tüm hidroalkolik çözelti uçurulana kadar buharlaştırılmış, geri kalanı biraz saf suda çözülüp 5 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

DNA oksidasyonuna karşı antioksidan etkilerini incelemek için ondört numune gerekir. Her numunenin hacmi 2500  $\mu$ L'dir ve aşağıdaki gibi açıklanan diğer içeriğe ek olarak 100  $\mu$ g DNA'dan oluşur: (1) sadece 100  $\mu$ g DNA, (2) Fenton (200  $\mu$ M  $H_2O_2$  ve 100  $\mu$ M  $Fe^{2+}$ ), (3) 50  $\mu$ M rutin, (4) 400  $\mu$ M izokuersitrin, (5) 409  $\mu$ L ekstrakt, (6) Fenton ve 411  $\mu$ L ekstrakt (50  $\mu$ M rutini içerir), (7) Fenton ve 411  $\mu$ L ekstrakt (400  $\mu$ M izokuersitrini içerir), (8) Fenton, 50  $\mu$ M rutin ve 400  $\mu$ M izokuersitrin, (9) Fenton ve 25  $\mu$ M rutin, (10) Fenton ve 50  $\mu$ M rutin, (11) Fenton ve 100  $\mu$ M rutin, (12) Fenton ve 200  $\mu$ M izokuersitrin, (13) Fenton ve 400  $\mu$ M izokuersitrin ve (14) Fenton ve 600  $\mu$ M izokuersitrin.

Her hazırlama 100  $\mu$ g DNA'nın cam tüpe konulmasıyla başlar. Ardından ultra saf su, antioksidan (veya bitki ekstraktı),  $H_2O_2$  ve  $FeSO_4$  ( $Fe^{2+}$ ) sırayla eklenmiştir. Tüm kullanılan



çözeltilerin daha önceki hazırlanan stok çözeltilerden istenilen konsantrasyonlarını hesaplayarak hazırlanmıştır.

Elde edilen HPLC sonuçlarına göre, 20 mL (5 mL'ye konsantre edilmiştir) bitki ekstraktındaki rutin konsantrasyonu 304 µM ve izokuersitrin konsantrasyonu 2456 µM'dır. İki bitki ekstrakt örneği (6 ve 7 numaralı) hazırlanmış, onlardan biri 50 µM rutin (6 numaralı) diğeri ise 400 µM izokuersitrin (7 numaralı) içerir.

Numunelerin içeriğini iyice karıştırdıktan sonra onlar iyice kapatılıp 20 dakika inkübatör'de 37°C bekletilmiştir. Sonra, numuneler -20°C'den daha soğuk ortamda 18 saat kadar dondurulmuş ve sonraki 24 saat içinde 0,1 mbar vakum altında -86°C soğutma sistemi içeren liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. 1 mL %60 (v/v) sulu formik asit her numuneye eklenip 30 dakika etüvde 130°C'de ısıtılarak numunelerin hidrolize edilmesi sağlanmıştır. DNA hasar ürünleri, GC-MS/MS'de tespit edilebilen serbest bazlar olarak hidroliz işlemi vasıtasıyla salınmaktadır (Cadet ve ark. 1997, Jaruga ve ark. 2008). Sonra numuneler 18 saat kadar dondurulmuş ve sonunda 24 saat liyofilize edildikten sonra GC-MS/MS'e vermek için hazırlıklar başlatılmıştır.

### **3.2.5. Gaz kromatografi - kütle spektrometre / kütle spektrometre (GC-MS/MS) analizi**

#### **3.2.5.1. Analiz yöntemi**

N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid (BSTFA) çözeltisi (%1 trimetilklorosilan içeren TMCS) türevlendirici olarak kullanılmıştır. Piridin ve türevlendirici çözeltisi ilgili örneğe eklenip vorteks ile iyice karıştırılıp bir vialde aktarılmıştır. Vialdeki örnek karıştırıldıktan sonra atmosferik oksidasyondan korunması için N<sub>2</sub> gazı eklenmiş ve sıcaklığa dayanıklı kapak ile kapatılmıştır. Numune 40 dakika 120°C'de türevlendirilip GC-MS/MS'e analizi için verilmiştir.

Yukarıdaki açıklanan yöntem her numuneyi hemen GC-MS/MS'e vermeden önce yapılmıştır. Çünkü numuneler zamanla bozular, bu nedenle numune hemen türevlendirildikten sonra ve 30 dakika bir süreç içinde GC-MS/MS'ye verilmesi en idealidir. GC-MS/MS ile her bir numune analizi için 17 dakika gerekir ve 2 kez enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Analiz GC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir. Elektron İyonizasyon (EI), 250°C iyon kaynağı sıcaklığı,

280°C MS aktarma hattı sıcaklığı GC-MS/MS şartları olarak kullanılmıştır. Helium gazı 1 mL/dakika akış hızı ile bir hareketli faz olarak kullanılmıştır. Agilent Durabond DB-5MS kolon (12 m uzunluğu, 0,20 mm çapı (narrow bore) ve 0,33 µm film) kullanılmıştır.

İkincil iyonizasyon argon ortamında gerçekleştirilmiştir. Hedef bileşiklere özgü uygun iyonların elde edilmesi için çarpışma enerjileri 0 – 30 eV arasında değiştirilerek bireysel çarpışma enerjilerinin değerleri ayarlanmıştır. Öncül (prekürsör) iyonlarının kütleleri çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

### 3.2.5.2. Gaz kromatografi - kütle spektrometre/kütle spektrometre analizi için kalibrasyon grafikleri

On sekiz DNA hasar ürünleri için kalibrasyon denklemleri Çizelge 3.2.5.2.1'de görüldüğü gibi Aybastier (2016)'dan alınmıştır.

**Çizelge 3.2.5.2.1.** DNA oksidatif baz hasar ürünleri için kalibrasyon grafiği denklemleri ve çalışılan doğrusal aralık değerleri (Aybastier 2016)

Molekül	Kalibrasyon denklemi	Regresyon katsayısı (R <sup>2</sup> )	Doğrusal aralık (µg/L)	Prekürsör iyon
56DHT	$y = 16646x + 18767$	0,9999	0,25–200	255
56DHU	$y = 29866x + 26116$	0,9999	0,25–200	241

5H5MH	$y = 139484x + 40828$	0,9995	0,25–200	73
5HH	$y = 332926x + 456151$	0,9999	0,10–200	147
5FU	$y = 37526x + 182000$	0,9985	0,50–200	73
5HU	$y = 180247x - 71952$	0,9983	0,25–200	241
5HMU	$y = 35141x + 5368$	0,9997	0,05–200	357
Alx	$y = 403716x - 448535$	0,9985	0,10–200	73
5HC	$y = 234156x - 344006$	0,9969	0,10–200	240
46D5NP	$y = 25379x - 19999$	0,9978	0,50–200	240
TG	$y = 650289x + 807385$	0,9966	0,10–200	116
5HMC	$y = 12495x - 2449$	0,9991	0,10–200	254
46D5FP (FapyAde)	$y = 123507x + 139198$	0,9998	0,10–200	73
8HA	$y = 204511x + 825496$	0,9918	0,10–200	352
2HA	$y = 8172x + 55630$	0,9104	0,25–200	130
FG (FapyGua)	$y = 99348x - 214935$	0,9962	0,25–200	442
28DHA	$y = 63055x - 139448$	0,9976	0,50–400	440
8OHG	$y = 82775x + 2508$	0,9874	0,10–25	440

56DHT: 5,6-Dihidrotiamin, 56DHU: 5,6-Dihidroksimetilurasil, 5H5MH: 5-Hidroksi-5-metilhidantoin, 5HH: 5-Hidroksihidantoin, 5FU: 5-Formilurasil, 5HU: 5-Hidroksiurasil, 5HMU: 5-(Hidroksimetil)urasil, Alx: Alloksan, 5HC: 5-Hidroksisitosin, 46D5NP: 4,6-Diamino-5-nitropirimidin, TG: Timin glikol, 5HMC: 5-(Hidroksimetil)sitosin, 46D5FP (FapyAde): 4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA (8-OH-Ade): 8-Hidroksiadenin, 2HA: 2-Hidroksiadenin, FG (FapyGua): 2,6-Diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-Dihidroksiadenin, 8OHG (8-OH-Gua): 8-Hidroksi-2-deoksiganin

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Toplam Fenol İçeriği (TPC)

Folin-Ciocalteu yöntemi sürgün ekstraktının toplam fenol içeriğini belirlemek için kullanılmıştır. Sürgünler, üreme organının modifiye bir formu olarak düşünülebilir. Bitkinin tırmanması ve desteklenmesi için kullanılır. Bu yüzden sürgünler birçok bileşik için bir depolama organı değildir. Dolayısıyla, bu çalışmadaki hedeflenen sürgünler  $7,83 \pm 0,08$  mg

GAE/g taze ağırlığı (FW) TPC'ni içerir. Yöntemin kalibrasyon denklemi çizelge 4.1.1'de görülmektedir.

Domínguez-Perles ve ark. (2014), iki asma ağacı türünün gövdelerindeki TPC'ni FC yöntemi kullanılarak belirlemişlerdir. Ekstraksiyon şartlarına bağlı olarak farklı sonuçlar almışlar ve sonuçlar 32,5 ile 44,42 mg GAE/g kuru ağırlık (dw) arasında değişmiştir. Ayrıca, Kantz ve Singleton (1990) asma ağaçlarının farklı kısımları için FC yöntemini gerçekleştirmişler, çekirdeklerde 32,5-37,6 mg GAE/g, gövdelerde 24,3-19,5 mg GAE/g ve yapraklarda 22,6-24,3 mg GAE/g aralıkları bildirilmiştir. Bizim çalışmamız sürgün kısımlarının TPC'ini incelemiş ve literatürde karşılaştırılabilecek herhangi bir bilgi yoktur, bu nedenle bu çalışmada elde edilen sonucu yukarıda değinilen asma ağaçlarının farklı kısımlarının çalışmalarının sonuçlarıyla karşılaştırırsak sürgünlerin ekstraktının TPC'si çok az bir miktar düşüktür. Diğer bir açıdan, bu sonuç HPLC-DAD analizi vasıtasıyla onaylanmıştır. HPLC-DAD sonuçları ekstraktta en azından üç fenolik bileşiğin bulunduğunu göstermiş ve diğer çıkan küçük piklerin ihmal edilebilecek miktarlarda bulunduğu düşünülmüştür.

**Çizelge 4.1.1.** Ekstraktın Folin-Ciocalteu ve CHROMAC yöntemleri kullanılarak bulunan toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitesi değerleri

Yöntem	$\lambda$ (nm)	Kalibrasyon denklemi	Sonuç
Folin-Ciocalteu	750	$y = 0,0314x - 0,0205$ $R^2 = 0,9942$	$7,83 \pm 0,08$ mg GAE <sup>a</sup> /g örnek
CHROMAC	540	$y = 0,0043x + 0,0801$ $R^2 = 0,9955$	$8,17 \pm 0,49$ mg TE <sup>b</sup> /g örnek

<sup>a</sup>: Gallik asit eşdeğeri, <sup>b</sup>: Troloks eşdeğeri

## 4.2. Sürgün Ekstraktı İçin Antioksidan Kapasitesi

Çizelge 4.1.1'de görüldüğü gibi, sonuç troloks eşdeğeri (TE)/g taze ağırlık (FW) örnek olarak temsil edilmiştir. *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktı (%20 etanollu ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak) sonucu,  $8,17 \pm 0,49$  mg TE/g FW metal oksidasyonu indirgeme mekanizması vasıtasıyla antioksidan kapasitesi göstermiştir. *Laurus nobilis* L. bitkisinin CHROMAC sonucu  $8,68 \pm 0,06$  mg TE / g kuru ağırlık ve CUPRAC sonucu da  $8,45 \pm 0,03$  mg TE / g kuru ağırlık kullanılarak belirtilmiştir (Işık ve ark. 2013). Bu sonuçlar *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının antioksidan kapasite sonucuyla yakın değerlerdedir. Bu testlere

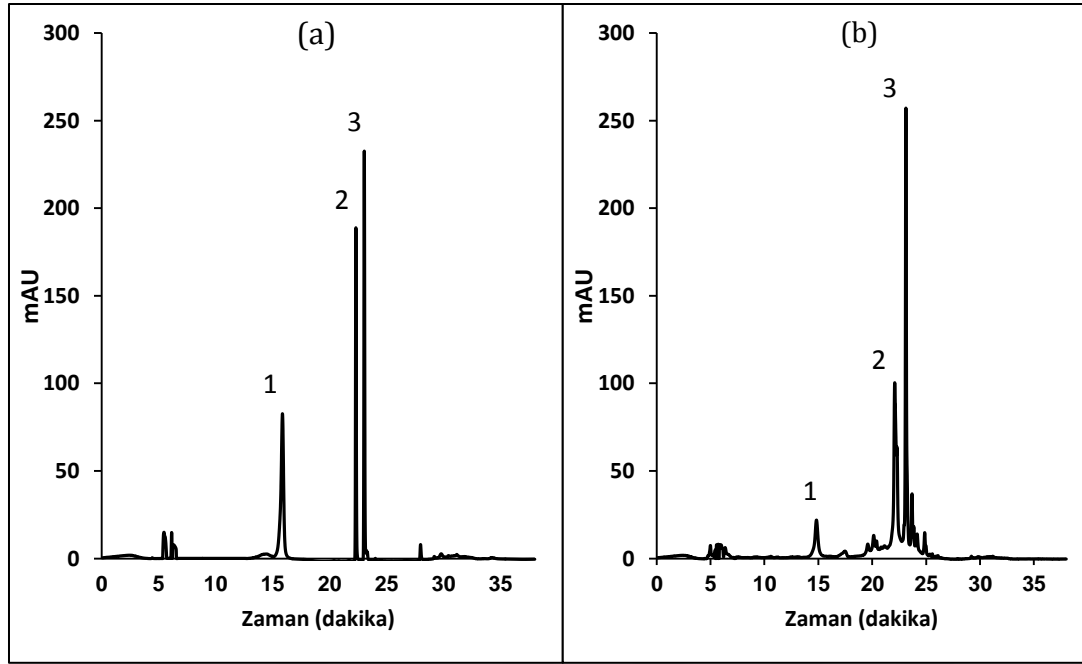
göre sürgün ekstraktı iyi bir antioksidan kapasiteye sahiptir ve eğer bunun üzerine yapılan çalışmalar arttırılırsa daha fazla bilgi edinilebilir.

Diğer bir çalışma, ultrasonik ile ekstrakte edilen üzüm poması (başlıca meyvenin dış kapağı ve çekirdeklerinden oluşur) antioksidan kapasitesini CUPRAC kullanılarak 53,47 TE/g FW (González-Centeno ve ark. 2014) ve toplam fenol içeriği ise 32,31 mg GAE/g FW olduğunu bildirmiştir. Genellikle, üzüm dış kapağı ve çekirdekleri dahil olmak üzere üzüm meyvesinin diğer asma ağacının kısımlarından daha yüksek fenol içeriğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmadaki CHROMAC sonucu yine *V. vinifera* (alfons) sürgünlerinin antioksidan kapasitesinin bir önem gösterdiğini ve üzüm pomasının %20'si kadar etkili bir antioksidan olabileceğini göstermiştir.

#### **4.3. Sürgün Ekstraktındaki Fenolik Bileşiklerin Tayini**

HPLC-DAD analizi, sürgünler ekstraktında üç temel fenol bileşiğinin klorojenik asit, rutin ve izokuersitrin olduklarını tespit etmiştir (Şekil 4.3.1). Fraternal ve ark. (2016)'in başka bir asma sürgünleri türü çalışmasında sürgünler ekstraktında 18'e kadar fenol bileşiğinin olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, klorojenik asidin miktarı  $0,43 \pm 0,01$  mg/g FW, rutin  $0,23 \pm 0,01$  mg/g FW ve izokuersitrin  $1,42 \pm 0,01$  mg/g FW oldukları gösterilmiştir (Çizelgeler 4.3.1, 4.3.2 ve 4.3.3). Rutin ve izokuersitrin miktarlarının, Fraternal ve ark. (2016) tarafından elde edilen miktarlara kıyasla yarısı kadar düşük olduklarını bulunmuştur. Farklı hazırlama koşulları, bitki materyali ekstraksiyonu ve kullanılan bitki türleri farklı sonuçların oluşmasına katkıda bulunur.



**Şekil 4.3.1.** (a) 60 mg/L standart klorojenik asit, rutin ve izokuersitrin ve (b) *V. vinifera* (alfons) ekstraktının 280 nm'de HPLC-DAD kromatogramları. 1: klorojenik asit, 2: rutin ve 3: izokuersitrin

**Çizelge 4.3.1.** 50 mL *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktında bulunan klorojenik asidin HPLC-DAD nicel sonuçları

İnj. No. (1/4 Seyrelti <sup>a</sup> )	Pik alanı	mg/L	mg/L x 4	Ortalama mg/L	mg/Ekstrakt	mg/g örnek
1	1072,9	22,06	88,24			
2	1033,2	21,27	85,07	86,83	4,34	0,43 ± 0,01
3	1059,7	21,80	87,19			

<sup>a</sup>: Ekstrakt örneği ekstraksiyon çözücü etanol ile 1:4 seyreltilmiştir

**Çizelge 4.3.2.** 50 mL *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktında bulunan rutin HPLC-DAD nicel sonuçları

İnj. No. (1/4 Seyrelti <sup>a</sup> )	Pik alanı	mg/L	mg/L x 4	Ortalama mg/L	mg/Ekstrakt	mg/g örnek
1	343,6	11,85	47,42			
2	316	11,14	44,55	46,33	2,32	0,23 ± 0,01
3	339,9	11,76	47,03			

<sup>a</sup>: Ekstrakt örneği ekstraksiyon çözücü etanol ile 1:4 seyreltilmiştir

**Çizelge 4.3.3.** 50 mL *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktında bulunan izokuersitrinin HPLC-DAD nicel sonuçları

İnj. No.	Pik alanı	mg/L	mg/L x 4	Ortalama	mg/Ekstrakt	mg/g örnek
----------	-----------	------	----------	----------	-------------	------------

(1/4 Seyrelti <sup>a</sup> )	mg/L					
1	3205	71,97	287,86			
2	3135,6	70,50	282,00	285,13	14,26	1,42 ± 0,01
3	3177,4	71,38	285,53			

<sup>a</sup>: Ekstrakt örneği ekstraksiyon çözücü etanol ile 1:4 seyreltilmiştir

Bu çalışmada, alkolik çözeltinin ve ekstraksiyon koşullarının hedeflenen bileşiklerin bütünlüğünün üzerindeki etkilerinin düşürülmesi ve çözücüyü ve koşulları gıda veya ilaç endüstrisinde diğer kullanımlarla uyumlu hale getirilmesi amaçlanmıştır (Domínguez-Perles ve ark. 2014). Bu amaç, etanol konsantrasyonunun %20'ye kadar düşürülmesi ve ultrasonik ekstraksiyon yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Da Porto ve ark. (2013) göre, ultrasonik ekstraksiyon fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerini korumakta ve verimini arttırmaktadır.

Kromatogram (Şekil 4.3.1) üç fenol bileşiği arka arkaya 15,8 dakikada klorojenik asit, 22,3 dakikada rutin ve son olarak 23,0 dakikada izokuersitrin göstermektedir. Rutinden önce ve izokuersitrinden sonra bazı küçük pikler çıkmıştır, bu pikler çalışmadaki hedeflenen bileşiklerden daha az ve ihmal edilebilecek miktarlarda başka bileşiklerin varlığını göstermektedir. O bileşikler, literatürde karşılaştırılabilir olarak bildirilen fenolik bileşikler de olabilir (Fraternali ve ark. 2016).

#### 4.4. Gaz Kromatografi – Kütle Spektrometre / Kütle Spektrometre Analizi ile Oksidatif Stresin DNA'ya Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışma, DNA hedeflenen biyolojik molekül olarak kullanılarak *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktındaki rutin ve izokuersitrinin antioksidan karakterlerini oksidatif stres ortamında incelemek için gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz daha verimli olabilmesi ve ekstrakte edilen bileşiklerin faydaları hakkında literatüre sunulacak yeterli bilginin elde edilebilmesi için detaylı basamaklardan oluşmuştur. On sekiz DNA hasar ürünü izlenip nicel analizi yapılmıştır (Çizelgeler 4.4.1 ve 4.4.2).

**Çizelge 4.4.1.** Kontrol numunelerindeki (Fenton ortamı içermez) DNA hasar ürünleri (ng/mg DNA) ve alıkonma zamanı değerleri

	Alıkonma zamanı (dk)	Kontrol	50 µM R <sup>a</sup>	400 µM Iq <sup>b</sup>	Ekstrakt
56DHT	4,79	0,49	<LOD <sup>c</sup>	<LOD	0,12

<b>56DHU</b>	4,81	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>5H5MH</b>	4,94	0,65	2,35	1,45	<LOD
<b>5HH</b>	5,17	<LOD	3,23	10,88	<LOD
<b>5FU</b>	5,95	14,60	12,80	3,60	31,41
<b>5HU</b>	6,22	<LOD	0,36	0,04	<LOD
<b>5HMU</b>	7,33	10,36	7,06	8,78	<LOD
<b>Alx</b>	7,39	1,60	2,10	0,34	2,17
<b>5HC</b>	7,57	3,06	8,41	5,59	2,32
<b>46D5NP</b>	7,74	1,13	1,65	1,59	1,65
<b>TG</b>	8,20	<LOD	<LOD	0,07	0,02
<b>5HMC</b>	8,34	6,91	9,48	6,45	0,34
<b>46D5FP (FapyAde)</b>	9,76	<LOD	1,27	3,60	19,37
<b>8HA</b>	11,29	<LOD	0,61	0,60	<LOD
<b>2HA</b>	12,47	<LOD	4,69	<LOD	<LOD
<b>FG (FapyGua)</b>	12,70	0,15	0,35	0,43	3,61
<b>28DHA</b>	13,50	1,11	0,95	0,89	0,42
<b>8OHG</b>	14,01	<LOD	3,78	<LOD	<LOD
<b>Toplam</b>	-	<b>40,07</b>	<b>59,09</b>	<b>44,31</b>	<b>61,45</b>

<sup>a</sup>: Rutin, <sup>b</sup>: izokuersitrin, <sup>c</sup>: GC-MS/MS'nin gözlenebilme sınırından daha az, 56DHT: 5,6-Dihidrotiamin, 56DHU: 5,6-Dihidroksimetilurasil, 5H5MH: 5-Hidroksi-5-methylhidantoin, 5HH: 5-Hidroksihidantoin, 5FU: 5-Formilurasil, 5HU: 5-Hidroksiurasil, 5HMU: 5-(Hidroksimetil)urasil, Alx: Alloksan, 5HC: 5-Hidroksisitosin, 46D5NP: 4,6-Diamino-5-nitropirimidin, TG: Timin glikol, 5HMC: 5-(Hidroksimetil)sitosin, 46D5FP (FapyAde): 4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA (8-OH-Ade): 8-Hidroksiadenin, 2HA: 2-Hidroksiadenin, FG (FapyGua): 2,6-Diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-Dihidroksiadenin, 8OHG (8-OH-Gua): 8-Hidroksi-2-deoksiganin

Şekil 4.4.1'de görüldüğü gibi, 5,6-dihidrotimin (56DHT) ve 5,6-dihidroksimetilurasil (56DHU) ilk çıkanlardır, bunlar hemen hemen aynı alıkonma zamanında çıkarlar ancak farklı moleküler iyonlar ile ayırt edilebilirler. 5-(Hidroksimetil)urasil (5HMU) ve alloksan (Alx) benzer durumdadır ancak alıkonma zamanları arasında farkı biraz daha geniştir. 56DHT ve 56DHU pikleri küçük çıkmışlar, dolayısıyla DNA ile Fenton reaksiyonundan bu iki DNA ürünü az miktarlarda üretilmiştir. 2,8-Dihidroksiadenin (28DHA), 2,6-diamino-hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) ve 4,6-diamino-5-nitropirimidin (46D5NP) daha küçük miktarlar görülmüştür, sonuncusu en küçüğüdür. Diğer hasar ürünleri neredeyse net bir şekilde iyice ayrılmışlar ve pikleri ayrı ayrı olarak çıkmışlardır. 56DHT, 56DHU ve 46D5NP pikleri girişimli başka piklerin varlığı ile ayrılmışlar ancak bu problem numune piklerini kalibrasyon grafiğindeki standartların pikleri ile eşleştirerek çözülmüştür. Şekil 4.4.1'deki 46D5FP'in pikinin yeterince büyük olmasına rağmen pik görüntülenecek şekilde çıkmamış ve tespit edilebildiği için GC-MS/MS yazılımının yakınlaştırma özelliğini (zoom in) kullanarak net çıkması sağlanabilir.

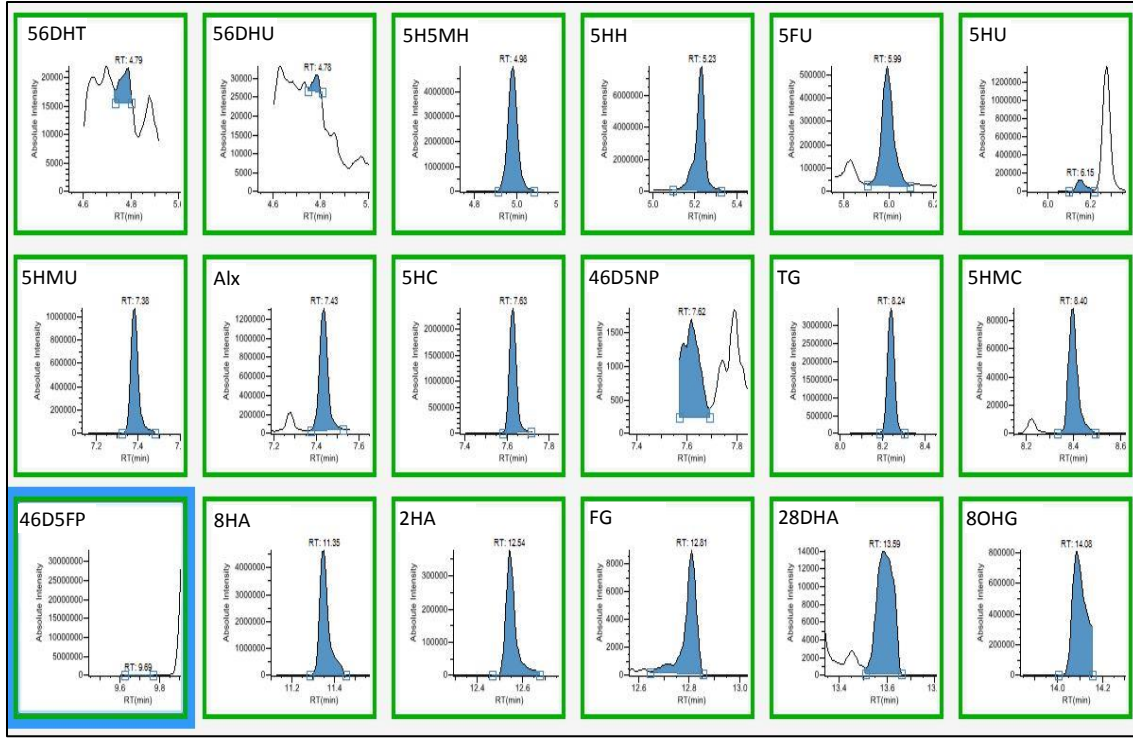


**Çizelge 4.4.2.** Oksidatif stres ortamı altında numunelerdeki (Fenton ortamı: 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 100 µM Fe<sup>2+</sup> içerir) DNA hasar ürünleri (ng/mg DNA) değerleri

	Kontrol	25 µM R <sup>a</sup>	50 µM R	100 µM R	200 µM Iq <sup>b</sup>	400 µM Iq	600 µM Iq	50 µM R+400 µM Iq	Ekstrakt
<b>56DHT</b>	0,13	<LOD <sup>c</sup>	<LOD	0,60	1,14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>56DHU</b>	0,87	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>5H5MH</b>	141,84	120,76	48,51	56,50	38,52	37,11	30,04	56,44	<LOD
<b>5HH</b>	78,98	27,37	18,35	14,57	12,37	10,12	8,18	13,17	<LOD
<b>5FU</b>	48,98	8,59	15,53	12,30	15,73	24,18	19,71	7,44	59,60
<b>5HU</b>	279,33	2,20	3,64	2,31	0,86	7,08	1,41	1,97	9,88
<b>5HMU</b>	94,54	61,86	38,12	27,53	33,86	39,48	33,71	46,92	0,72
<b>Alx</b>	10,38	0,59	0,97	2,17	0,99	0,90	0,55	1,57	5,52
<b>5HC</b>	25,69	29,92	18,45	16,75	21,67	22,71	20,12	27,37	2,32
<b>46D5NP</b>	1,32	1,15	1,17	1,24	1,17	1,18	1,15	1,28	39,78
<b>TG</b>	10,64	6,77	3,15	3,02	2,49	3,09	2,95	3,43	0,37
<b>5HMC</b>	18,91	19,57	10,21	7,21	18,37	7,18	5,55	9,90	27,74
<b>46D5FP</b>	13,98	64,68	59,84	2,95	89,62	33,72	13,11	11,18	44,86
<b>8HA</b>	71,44	24,43	6,41	1,85	0,00	6,60	1,83	1,54	<LOD
<b>2HA</b>	124,15	70,95	27,81	0,42	8,14	13,94	<LOD	<LOD	<LOD
<b>FG</b>	3,23	0,24	0,62	3,30	0,28	0,28	0,29	3,08	3,32
<b>28DHA</b>	1,90	0,42	0,42	0,67	0,64	0,76	0,92	1,26	0,87
<b>8OHG</b>	46,60	13,38	22,49	3,11	49,21	61,17	66,93	6,48	<LOD
<b>Total</b>	<b>972,90</b>	<b>452,88</b>	<b>275,68</b>	<b>156,52</b>	<b>295,05</b>	<b>269,50</b>	<b>206,47</b>	<b>193,02</b>	<b>194,99</b>

<sup>a</sup>: Rutin, <sup>b</sup>: izokuersitrin, <sup>c</sup>: GC-MS/MS'nin gözlenebilme sınırından daha az, 56DHT: 5,6-Dihidrotiamin, 56DHU: 5,6-Dihidroksimetilurasil, 5H5MH: 5-Hidroksi-5-methylhidantoin, 5HH: 5-Hidroksihidantoin, 5FU: 5-Formilurasil, 5HU: 5-Hidroksiurasil, 5HMU: 5-(Hidroksimetil)urasil, Alx: Alloksan, 5HC: 5-Hidroksisitosin, 46D5NP: 4,6-Diamino-5-nitropirimidin, TG: Timin glükol, 5HMC: 5-(Hidroksimetil)sitosin, 46D5FP: 4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA (8-OH-Ade): 8-Hidroksiadenin, 2HA: 2-Hidroksiadenin, FG (FapyGua): 2,6-Diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-Dihidroksiadenin, 8OHG (8-OH-Gua): 8-Hidroksi-2-deoksiganin

Bazı DNA hasar ürünleri ya bulunmamış ya da GC-MS/MS tarafından algılanamamış ve bu nedenle Çizelgeler 4.4.1 ve 4.4.2'de gözlenebilme sınırından daha az (< LOD) olarak temsil edilmiştir. Çizelge 4.4.1'de sunulan veriler, beklendiği gibi, DNA hasar ürünlerinin konsantrasyonlarının daha az miktarlarında bulunmuşlar, tabii ki Fenton (oksidatif stres) ortamının olmamasından; bu sonuç, Çizelge 4.4.1'deki hasar ürünlerinin toplam konsantrasyonları ile Çizelge 4.4.2'deki oksidatif stress ortamında olan numunelerin hasar ürünleri toplam konsantrasyonları karşılaştırıldığında Fenton reaksiyonu etkisini göstermiştir. Çizelge 4.4.1 fazla incelendiğinde, 5-formilurasil (5FU), 5HMU, 5-(hidroksimetil)sitosin (5HMC) ve 5-hidroksisitosin (5HC)'in sırayla en yüksek konsantrasyonlara sahip oldukları ve 56DHU'un GC-MS/MS tarafından algılanmadığı bulunmuştur. Çizelge 4.4.2'deki veriler, Çizelge 4.4.1'dekinden farklı bir değişiklik göstererek oksidatif stres ortamında yapılan deneylerde DNA hasar ürünleri konsantrasyonlarının önemli ölçüde arttığını göstermiştir.



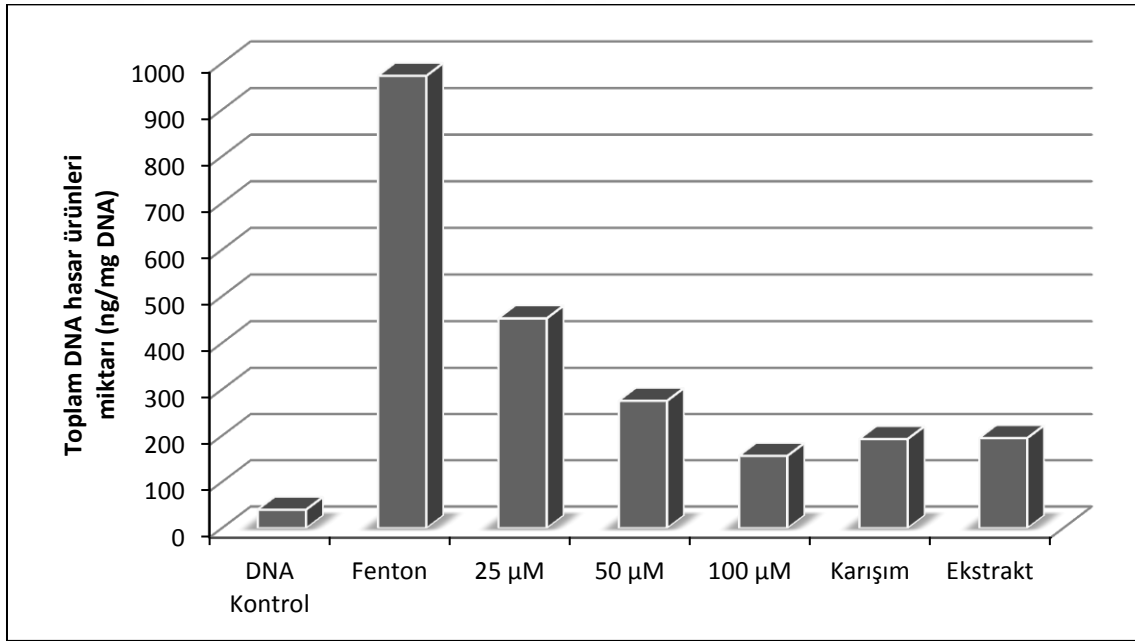
**Şekil 4.4.1.** 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  içeren ortamdaki DNA'ya ait GC-MS/MS kromatogramı (56DHT: 5,6-Dihidrotiamin, 56DHU: 5,6-Dihidroksimetilurasil, 5H5MH: 5-Hidroksi-5-metilhidantoin, 5HH: 5-Hidroksihidantoin, 5FU: 5-Formilurasil, 5HU: 5-Hidroksiurasil, 5HMU: 5-(Hidroksimetil)urasil, Alx: Alloksan, 5HC: 5-Hidroksisitosin, 46D5NP: 4,6-Diamino-5-nitropirimidin, TG: Timin glikol, 5HMC: 5-(Hidroksimetil)sitosin, 46D5FP: 4,6-Diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA (8-OH-Ade): 8-Hidroksiaadenin, 2HA: 2-Hidroksiaadenin, FG (FapyGua): 2,6-Diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-Dihidroksiaadenin, 8OHG (8-OH-Gua): 8-Hidroksi-2-deoksiganin)

Bölüm 3.2.4'de açıklanan 6 ve 7 numaralı numunelerin sonuçlarının daha iyi temsil edeceği için birlikte bir araya getirilip ortalama olarak sunulmasına karar verilmiştir. 56DHT ve 56DHU, Fenton reaksiyon ortamındaki numunelerde nadir görünür.

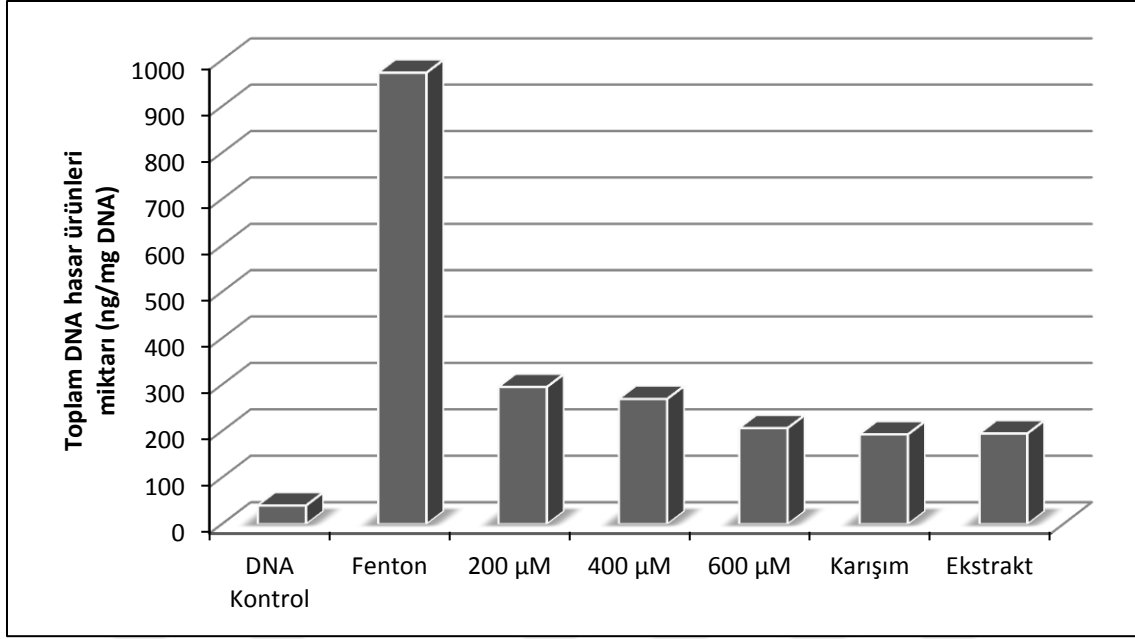
5-Hidroksi-metilhidantoin (5H5MH), 5HMU, 4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin (46D5FP), 5-hidroksiurasil (5HU), 8-hidroksi-2-deoksiganin (8OHG / 8-OH-Gua), 2-hidroksiaadenin (2HA) ve 5FU neredeyse sık görünüş göstermiş ve diğer ürünler arasında en yüksek konsantrasyona sahip olmuştur.

Toplam sonuçların karşılaştırıldığında, farklı konsantrasyonlarda kullanılan rutin ve izokuersitrin standartlarının ve *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının antioksidan aktivitesinin varlığının ispatlandığı gösterilmiştir. DNA hasarının önlenmesi ile rutin ve izokuersitrinin orantılı bir ilişkisi vardır. Bu ilişki Şekiller 4.4.2 ve 4.4.3'de gösterilmiştir. Rutin konsantrasyonunun artışının, izokuersitrininkine kıyasla daha etkili bir antioksidan etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Rutin konsantrasyonunun iki kat çıkması, DNA hasar

ürünleri konsantrasyonunun yaklaşık %40 oranında azalmasına katkıda bulunmuş, izokuersitrin konsantrasyonunun iki kat çıkması ise, hasar ürünleri konsantrasyonunun sadece yaklaşık %10 azalmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca, rutin, izokuersitrininkinden daha düşük konsantrasyonlarda kullanılmış bu nedenle rutinin daha güçlü antioksidan olduğunu bir kanıt vermiştir.



**Şekil 4.4.2.** Standart rutin ve *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının oksidatif hasar ürünleri oluşumuna etkisi (25, 50 ve 100 µM standart rutin konsantrasyonlarıdır, Karışım: 50 µM rutin ve 400 µM izokuersitrin, Ekstrakt: 50 µM rutin ve 400 µM izokuersitrin konsantrasyonları eşdeğerindedir)



**Şekil 4.4.3.** Standart izokuersitrin ve *V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktının DNA oksidatif hasar ürünleri oluşumuna etkisi (200, 400 ve 600 µM standart izokuersitrin konsantrasyonlarıdır, Karışım: 50 µM rutin ve 400 µM izokuersitrin, Ekstrakt: 50 µM rutin ve 400 µM izokuersitrin konsantrasyonları eşdeğerindedir)

## 5. SONUÇ

*V. vinifera* (alfons) sürgün ekstraktı, DNA hasarının önlenmesi ve GC-MS/MS analizinin incelenmesi yoluyla ilgili standart bileşikler rutin ve izokuersitrin ile karşılaştırılabilir antioksidan aktivite göstermiştir. Ekstraktın fenol içeriğinin beklenenden daha düşük olmasına rağmen, yüksek duyarlı GC-MS/MS analizi bitki ekstraktının etkileyici antioksidan güçlerine sahip olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada planlanan ekstraksiyon ve analiz yöntemlerinde, asma ağaçlarının sürgünlerinden çıkabilen ve kullanılabilir beslenme ürünlerinin büyük çapta üretilmesine, uygulanabilirliğine yönelik bazı özelliklere dikkat edilmiştir.

Genel antioksidan kapasitesi yöntemleri antioksidan etkilerinin değerli ve güvenli bilgiler sağlayabilir, ancak bazen GC/MS veya LC/MS gibi hassas ve duyarlı analiz yöntemlerinin uygulanması tercih edilir, bu yöntemler maddelerin kimyasal yapılarının varlığından emin olur hem de o maddelerin biyolojik ve terapötik etkilerinin keşf edilmesine yardımcı olmaktadır.

Oksidasyondan DNA baz hasar ürünlerinin üretimi, farklı antioksidan güçlere sahip olan rutin ve izokuersitrin antioksidanları tarafından azalmıştır. Bu nedenle diğer antioksidanlar da DNA hasar ürünlerinin üretimini azaltmada etkinlik gösterebilir. Antioksidanların DNA oksidasyon hasarına karşı etkileri üzerine daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKÇA

**Alamed, J., Chaiyasit, W., Mcclements, D. J., Decker, E. A. 2009.** Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 7: 2969–2976.

**Anonim, 2009.** Bahçecilik Asma Yetiştiriciliği. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, 1-36.

**Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. 2004.** Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *JOUR. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970–7981.

**Aybastier, Ö. 2016.** DNA'nın Oksidatif Hasarı Üzerine Fenolik Maddelerin Etkisi. *Doktora Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.

**Barber, G. A., Behrman, E. J. 1991.** The synthesis and characterization of uridine 5'-( $\beta$ -1-rhamnopyranosyl diphosphate) and its role in the enzymic synthesis of rutin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288: 239–242.

**Beckman, R. A., Loeb, L. A. 2005.** Genetic instability in cancer : Theory and experiment. *Seminars in Cancer Biology*. *Academic Press*, 15: 423–435.

**Benzie, I. F. F., Strain, J. J. 1996.** The Ferric Reducing Ability of Plasma ( FRAP ) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical biochemistry*, *Academic Press*, 239: 70–76.

**Bhattacharya, S. 2015.** Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., Springer India, 17–29.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset C. 1995.** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food science and Technology*, 30: 25–30.

**Brewer, M. S. 2011.** Natural Antioxidants : Sources , Compounds , Mechanisms of Action , and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (4): 221-247.

**Brown, J. E., Kelly M. F. 2007.** Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 66–71.

**Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D. 2007.** Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81: 236–242.

**Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J. 1997.** Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 131: 1–87.

**Calonje, M., Cubas, P., Martínez-Zapater, J., Carmona, M. 2004.** Floral meristem identity genes are expressed during tendrill development in grapevine. *Plant physiology*, 135: 1491–501.

**Cantos, E., Garcia-Viguera, C., De Pascual-Teresa, S., Tomas-Barberan, F. A. 2000.** Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4606–4612.

**Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. 1993.** Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 303–311.

**ÇELİK, S. 1998.** *Bağcılık*. Editör: S. ÇELİK. 1. baskı. Tekirdağ Ziraat Fakültesi.

**Chance, B., Sies, H., Boveris, A. 1979.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59: 527–605.

**D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43: 348–361.

**Dai, J., Mumper, R. 2010.** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313–7352.

**Delaunay, J., Castagnino, C., Chèze, C., Vercauteren, J. 2002.** Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 964: 123–128.

**Dholia, N., Ramteke, P., Varghese, J., Rani, V., Yadav, U.S. 2015.** Oxidative Stress-Induced Molecular and Genetic Mechanisms in Human Health and Diseases: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U.S., Springer India, 91–103.

**Dizdaroglu, M. 2012.** Oxidatively induced DNA damage : Mechanisms , repair and disease. *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 327(1): 26-47.

**Domínguez-Perles, R., Teixeira, A. I. , Rosa, E., Barros, A. I. 2014.** Assessment of (poly)phenols in grape (*Vitis vinifera* L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and Response Surface Methodology. *Food Chemistry* 164: 339–346.

**Embuscado, M. 2015.** Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*. 18: 811–819.

**Evans, M., Dizdaroglu, M., Cooke, M. 2004.** Oxidative DNA damage and disease: induction , repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567: 1-61.

**Fenton, H. J. H. 1894.** LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. Article. *J. Chem. Soc.{,} Trans.. The Royal Society of Chemistry*, 65: 899–910.

**Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentao, P., Andrade, P., Bento, A., Alberto Pereira, J. 2013.** *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 43: 434–440.

**Fraternale, D., De Bellis, R., Calcabrini, C., Potenza, L., Cucchiari, L., Mancini, U., Dachà, M., Ricci, D. 2011.** Aqueous extract from *Vitis vinifera* tendrils is able to enrich keratinocyte antioxidant defences. *Natural product communications*, 6: 1315—1319.

**Fraternale, D., Rudov, A., Prattichizzo, F., Olivieri, F., Ricci, D., Giacomini, E., Carloni, S., Azzolini, C., Gordillo, B., Jara-Palacios, M., Verardo, G., Albertini, M. 2016.** Chemical composition and “in vitro” anti-inflammatory activity of *Vitis vinifera* L. (var. Sangiovese) tendrils extract. *Journal of Functional Foods*, 20: 291–302.

**Friedberg, E. C. 2001.** How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews Cancer* 1: 22–33.

**Fuentes, E., Palomo, I. 2016.** Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. *Life Sciences*, 148: 17-23.

**Gerald, S. 1993.** Autoxidation and antioxidants: historical perspectives: Atmospheric oxidation and antioxidants, Editörler: Gerard Meurant, Elsevier, pp: 30.

**Ghadge, G., Lee, J., Bindokas, V., Jordan, J., Ma, L., Miller, R., Roos, R. 1997.** Mutant Superoxide Dismutase-1-Linked Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms of Neuronal Death and Protection. *The Journal of Neuroscience*, 17(22): 8756–8766.

**Ghafoor, K., Choi, Y., Jeon, J., Jo, I. 2009.** Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4988–4994.

**González-Centeno, M., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A. 2014.** Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6): 2176-2184.

**Gutteridge, J., Halliwell, B. 2010.** Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393: 561–564.

**Haber, F., Weiss, J. 1934.** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London*, 147(861): 332–351.

**Halliwell, B., Gutteridge, J. 2015a.** Free Radicals in Biology and Medicine. 5. baskı. Oxford University Press, USA, pp: 77.

**Halliwell, B., Gutteridge, J. 2015b.** Measurement of Reactive Species: Free radicals in biology and medicine, Editörler: Halliwell, B., Gutteridge, J., 5. baskı., Oxford University Press, USA, 284–353.

**Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. 2005.** Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 268S–276.

**Halliwell, B., Whiteman, M. 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ?, *British Journal of Pharmacology*, 142: 231–255.

**Harman, D. 1956.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, 11: 298–300.

**Hertog, M., Feskens, E., Kromhout, D., Hertog, M., Hollman, P., Hertog, M., Katan, M. 1993.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342: 1007–1011.

**Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013.** Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119–124.

**Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. 2008.** Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589–598.

**Islam, M., Shekhar, H. 2015.** Impact of Oxidative Stress on Human Health: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., Springer India, 59–73.

**Iwashina, T. 2000.** The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113: 287–299.

**Jaruga, P., Kirkali, G., Dizdaroglu, M. 2008.** Measurement of formamidopyrimidines in DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 1601–1609.



**Jung, S., Kim, B., Lee, E., Osborne, N. 2010.** Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochemistry International*, 57: 713–721.

**Kantz, K., Singleton, V. 1990.** Isolation and Determination of Polymeric Polyphenols Using Sephadex LH-20 and Analysis of Grape Tissue Extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(3): 223–228.

**Katalinić, V., Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Teskera, A., Konta, I., Boban, M. 2009.** Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *J. Food Sci. Technol.*, 1: 7–15.

**Keller, M. 2015.** Botany and anatomy: The Science of Grapevines, Editörler: Keller, M. 2<sup>nd</sup> ed., 1–57.

**Kelly, R., Yeo, K., Isaac, H., Lee, C., Huang, S., Teng, L., Halliwell, B., Wise, S. 2008.** Lack of effect of acute oral ingestion of vitamin C on oxidative stress, arterial stiffness or blood pressure in healthy subjects. *Free Radical Research*, 42: 514–522.

**Kohen, R., Nyska, A. 2002.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620–650.

**Kolb, C., Kaser, M., Kopecky, J., Zotz, G. 2001.** Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. *Plant Physiology*, 127(3): 863–875.

**Kryston, T., Georgiev, A., Pissis, P., Georgakilas, A. 2011.** Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711: 193–201.

**Li, B., Pratt, D. 2015.** Methods for determining the efficacy of radical-trapping antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 82: 187–202.

**Lucci, N., Mazzafera, P. 2009.** Rutin synthase in fava d'anta: purification and influence of stressors. *Canadian Journal of Plant Science*, 89: 895–902.

**Maki, H., Sekiguchi, M. 1992.** MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, 355: 273–5.

**Makris, D., Kallithraka, S., Kefalas, P. 2006.** Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 396–404.

**Mani, S. 2015.** Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 3–15.

**Maurya, P. K., Noto, C., Rizzo, L. B., Rios, A., Nunes, S., Barbosa, D. S., Sethi, S., Zenti,**

**M., Mansur, R., Maes, M., Brietzke, E. 2016.** The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65: 134–144.

**Nawar, WF. 1996.** Lipids: Food chemistry, Editörler: Fennema, O., 3. baskı., Marcel Dekker Incorporation, New York, USA, pp: 225–320.

**Neeley, W. L., Essigmann, J. M. 2006.** Mechanisms of Formaiton, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology*, 19(4): 491-505.

**Oliveira, R. Almeida, M. F., Santos, L. Madeira, L. M. 2006.** Experimental design of 2,4-dichlorophenol oxidation by Fenton's reaction. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45: 1266–1276.

**Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., Nicotera, P. 1989.** Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(7): 281-285.

**Oszmianski, J., Lee, C. Y. 1990.** Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 41: 204–206.

**Palmieri, B., Sblendorio, V. 2010.** Current status of measuring oxidative stress. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 594: 3–17.

**Phillips, M., Sabas, M., Greenberg, J. 1993.** Increased pentane and carbon disulfide in the breath of patients with schizophrenia. *Journal of clinical pathology*, 46(9), 861-864.

**Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. 2013.** Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20: 1076–1080.

**Pussa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., Raal, A. 2006.** Survey of Grapevine *Vitis vinifera* Stem Polyphenols by Liquid Chromatography – Diode Array Detection – Tandem Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 7488–7494.

**Rani, V., Asthana, S., Vadhera, M., Yadav, U. S., Atale, N. 2015.** Tools and Techniques to Measure Oxidative Stress: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 43–56.

**Rani, V., Gupta, K. 2015.** ROS in Carcinogenesis and Anticancerous Drug-Induced Toxicity: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 209–225.

**Rani, V., Jain, A. 2015.** Oxidative Stress and Its Biomarkers in Cardiovascular Diseases: An Overview: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 131–141.

**Rani, V., Yadav, U. S. 2015.** Free Radicals in Human Health and Disease. Springer India.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999.**

Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231–1237.

**Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascuña, J., García Romero, E. 2006.** Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687–693.

**Saggu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F. R., Lees, A., Jenner, P., Marsden, C. D. 1989.** A Selective Increase in Particulate Superoxide Dismutase Activity in Parkinsonian Substantia Nigra. *Journal of Neurochemistry*, 53: 692–697.

**Schaich, K. M., Tian, X., Xie, J. 2015.** Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 18: 782–796.

**Sen, S., Chakraborty, R. 2015.** Antioxidant Supplements: Friend or Foe?: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 293–322.

**Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., Ames, B. N. 1994.** Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91(23): 10771–10778.

**Silva, M. M., Santos, M. R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L. 2002.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free radical research*, 36: 1219–27.

**Singh, R. P., Sharad, S., Kapur, S. 2004.** Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 5: 218–25.

**Somasundaram, V., Nadhan, R., Hemalatha, S. K., Sengodan, S. K., Srinivas, P. 2016.** Nitric oxide and reactive oxygen species: Clues to target oxidative damage repair defective breast cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 101: 184-192.

**Sousa, E. C., Uchôa-thomaz, A. M. A., Osvaldo, J., Carioca, B., De Moraes, S. M., De Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A., Rodrigues, A. L., Rodrigues, S. P., Silva, J. N., Rodrigues, L. L. 2014.** Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34: 135–142.

**Steenken, S. 1987.** Addition-Elimination Paths in electron-transfer Reactions between Radicals and Molecules. Oxidation of Organic Molecules by the OH Radical. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.*, 83: 113–124.

**Steenken, S. 1989.** Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chemical Reviews*, 89: 503–520.

**Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E. 2013.** Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of

antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141: 1361–1368.

**Şahin, S., Demir, C. 2013.** Antioksidan kapasite tayini yöntemi. Turkey: Türkiye Patent, Patent No. TPE-2013/06324.

**Toaldo, I. M., Cruz, F. A., da Silva, E. L., Bordignon-Luiz., M. T. 2016.** Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (*Vitis labrusca* L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals. *Nutrition Research*, 36: 808–817.

**Wenzel, J., Samaniego, C. S., Wang, L., Nelson, L., Ketchum, K., Ammerman, M., Zand, A. 2015.** Superheated liquid and supercritical denatured ethanol extraction of antioxidants from Crimson red grape stems. *Food Science & Nutrition*, 3: 569–76.

**Wojtunik-kulesza, K. A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Waksmundzka-hajnos, M. 2016.** The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78: 39–49.

**Yadav, U. S. 2015.** Oxidative Stress-Induced Lipid Peroxidation: Role in Inflammation: Free Radicals in Human Health and Disease, Editörler: Rani, V., Yadav, U. S., New Delhi, Springer India, 119–129.

**Yilmaz, Y., Toledo, R. T. 2004.** Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 255–260.

**Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., Folsom, A. R. 1999.** Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American journal of epidemiology*, 149: 943–949.

**Anonim, 2016.** Scientific Classification of Grape. <http://www.fruitvs.com/en/scientific-classification-of-grape/model-22-5> (11/11/2016).

**Anonim, 2016.** Grape Facts. <http://www.fruitvs.com/en/grape-facts/model-22-7> (11/11/2016).

**Anonim, 2016.** Grape – *Vitis vinifera*. Properties and benefits. <http://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/herbs-medicinal-plants/grape-benefits/> (11/11/2016).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sam DAWBAA

Doğum Yeri ve Tarihi : Dhamar, Yemen - 1986

Yabancı Dili : English & Türkçe

## Eğitim Durumu

Lise : Oqba Ibn Nafe'e Lisesi, 2004.

Lisans : Eczacılık BSc, Thamar Üniversitesi, Yemen, 2010

## Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

- Araştırma görevlisi, Thamar Üniversitesi, 2010-.
- Farmasötik analizci, Global Drug Industries, Yemen, 2012.

İletişim : [sdoubaa@yahoo.com](mailto:sdoubaa@yahoo.com)

Yayınları :

1. **Alkhali, K., Alzomor, A., Alavudeen, S., Khan, N., Dawbaa, S. 2013.** Bacterial Resistance of Antibiotics used in Urinary Tract Infections. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6 (1): 87-91.
2. **Dawbaa, S., Aybastier, Ö., & Demir, C. 2017.** Ultrasensitive Determination of DNA Oxidation Products by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and the Role of Antioxidants in the Prevention of Oxidative Damage. *Journal of Chromatography B*, 1051: 84-91