

**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN DNA OKSİDASYONUN
ÖNLENMESİNDEKİ SİNERJİSTİK VE ANTAGONİSTİK
ETKİLERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

Gizem BAYAÇLI



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN DNA OKSİDASYONUN ÖNLENMESİNDEKİ
SİNERJİSTİK VE ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN ANALİTİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Gizem BAYAÇLI
0000-0001-9676-5531

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Gizem BAYAÇLI tarafından hazırlanan “BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN DNA OKSİDASYONUN ÖNLENMESİNDEKİ SİNERJİSTİK VE ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Başkan	:	Prof. Dr. Saliha ŞAHİN 0000-0003-2887-5688 Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Prof. Dr. Elif TÜMAY ÖZER 0000-0002-5225-0146 Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye	:	Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER 0000-0002-0290-1166 Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

../../....

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım 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 normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17/02/2023

Gizem BAYAÇLI

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
17.02.2023

Gizem BAYAÇLI
17.02.2023

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN DNA OKSİDASYONUN ÖNLENMESİNDEKİ SİNERJİSTİK VE ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Gizem BAYAÇLI

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Fenolik bileşikler sahip oldukları antioksidan aktivite sayesinde insan sağlığı için önem arz etmektedir. Bu nedenle fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin sinerjistik ve antagonistik etkileri açısından araştırılması gereklidir. Özellikle gıda kaynaklı ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerin tüketimi sırasında insan sağlığı açısından antioksidan etkilerinin aksine prooksidan etkileri de oluşabilir. Tez kapsamında kafeik asit, rosmarinik asit ve gallik asit gibi temel fenolik bileşikler seçilerek antagonistik/sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kafeik asit (KA), rosmarinik asit (RA) ve gallik asit (GA) için literatüre göre toksik olmayan derişim değerleri (2,54-9,46 μM) belirlenmiştir. Optimizasyon tekniklerinden merkezi kompozit dizayn kullanılarak belirlenen derişim aralığında KA, RA ve GA'nın toplam antioksidan aktivitesi maksimum olacak şekilde optimum derişim değerleri belirlenmiştir. Optimum derişim değerleri ile belirlenen toplam fenolik madde (Folin-Ciocalteu yöntemi) ve antioksidan kapasite (FRAP yöntemi) değerleri tahmini değerlerle uyumlu bulunmuştur. Daha sonra belirlenen optimum derişimler de KA, RA ve GA'nın Fenton reaksiyonu ortamında DNA oksidasyonunu önleme kabiliyeti belirlenmiştir. Bunun için Fenton reaksiyon ortamında oluşan DNA oksidasyon hasar ürünleri Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometrisi/Kütle Spektrometrisi (GC-MS/MS) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Buna göre; Folin yöntemi (7,87 μM KA; 6,75 μM RA; 9,42 μM GA) için %37,17 ve FRAP yöntemi (8,03 μM KA; 9,34 μM RA; 6,00 μM GA) için %40,17 DNA oksidasyonunun önleendiği sonucu elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenolik bileşik, sinerjistik, antagonistik, antioksidan, DNA
2023, xiv + 72 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC AND ANTAGONISTIC EFFECTS OF SOME POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN PREVENTION OF DNA OXIDATION BY ANALYTICAL METHODS

Gizem BAYAÇLI

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

Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Phenolic compounds are important for human health thanks to their antioxidant activity. Therefore, it is necessary to investigate the synergistic and antagonistic effects of phenolic compounds in terms of their antioxidant activities. Prooxidant effects may also occur in contrast to their antioxidant effects in terms of human health, especially during the consumption of phenolic compounds found in food-based products. Within the scope of the thesis, basic phenolic compounds such as caffeic acid, rosmarinic acid and gallic acid were selected and their antagonistic/synergistic effects were investigated. For this purpose, non-toxic concentration values (2.54-9.46 μM) were determined for caffeic acid, rosmarinic acid and gallic acid according to the literature. Optimum concentration values of caffeic acid, rosmarinic acid and gallic acid were used by using Central composite design, which is one of the optimization techniques, for maximum total antioxidant properties. Total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) and antioxidant capacity (FRAP method) values determined by optimum concentration values were found to be compatible with the estimated values. Then, the ability of caffeic acid, rosmarinic acid and gallic acid to inhibit DNA oxidation in the Fenton reaction medium at optimum concentrations was determined. For this, DNA oxidation damage products formed in Fenton reaction medium were quantitatively determined by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). Accordingly, it was concluded that 37.17% DNA oxidation was prevented for the Folin method (7.87 μM KA, 6.75 μM RA, 9.42 μM GA) and 40.17% for the FRAP method (8.03 μM KA, 9.34 μM RA, 6.00 μM GA).

Key words: Phenolic compound, synergistic, antagonistic, antioxidant, DNA
2023, xiv + 72 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Tez dönemi boyunca bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocalarım Doç. Dr. Önder AYBASTIER ve Doç. Dr. Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim ve deneysel çalışmalarım boyunca birlikte eğlendiğimiz, birlikte üzüldüğümüz, bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen onları iyi ki tanımışım dediğim canım arkadaşlarım Dr. Büşra KARKAR, İlyaz PATİR, Serenay EYÜBOĞLU ve Elif TÜLEK'e,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sevgilerini eksik etmeyen annem Sevim ve babam Ahmet BAYAÇLI'ya, iyi, kötü her anımda bana destek olan canım ablam Gamze BAYAÇLI DEMİR ve eniştem Serhan DEMİR'e

TEŞEKKÜR EDERİM.

Gizem BAYAÇLI
17/02/2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Polifenolik Bileşikler	3
2.2. Polifenollerin Sınıflandırılması.....	3
2.2.1. Fenolik Asitler	3
2.2.2. Flavonoidler	4
2.2.3. Flavonlar ve Flavonoller.....	5
2.2.4. Flavanonlar	6
2.2.5. İzoflavonlar ve Neoflavonoidler	6
2.2.6. Kalkonlar	6
2.2.7. Flavanoller	7
2.2.8. Antosiyanidinler	7
2.2.9. Diğer Polifenoller	7
2.3. Fenolik Bileşiklerin Biyolojik Etkileri.....	7
2.4. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan-Prooksidan Dengesi	8
2.4.1. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri.....	8
2.4.2. Fenolik Bileşiklerin Yapısı ve Antioksidan Aktivitesi Arasındaki İlişkiler....	9
2.4.3. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özelliğini Tayin Yöntemleri	11
2.4.4. Fenolik Bileşiklerin Prooksidan Özelliği	16
2.4.5. Polifenollerin Yapısı ve Prooksidan Aktivitesi Arasındaki İlişkiler.....	20
2.5. Antioksidanlar Arasındaki Etkileşim Türleri	30
2.6. Antioksidanların Sinerjistik Etkileşimleri	31
2.7. DNA'nın Yapısı	32
2.8. Oksidatif Stres.....	33
2.9. Oksidatif Stres Sonucu DNA Parçalanma Ürünleri	33
2.10. Oksidatif Stres Sonucu DNA Hasarının Onarımı	34
2.11. DNA Oksidatif Hasarı Tayin Yöntemleri.....	35
2.11.1. Comet Deneyi	35
2.11.2. İmmünokimyasal yöntemler	36
2.11.3. GC-MS.....	36
2.11.4. HPLC-ECD.....	37
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar	38
3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar.....	39
3.1.3. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler.....	40
3.1.4. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler	41
3.2. Yöntem	42
3.2.1. Spektroskopik yöntemler	42
3.2.2. Kemometrik çalışmalar	43

3.2.3. DNA oksidatif hasar ürünlerinin belirlenmesi	45
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	48
4.1. Kemometrik yöntemler.....	48
4.2. GC-MS/MS analizi	54
5. SONUÇ	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

A	Adenin
A ₁	Antioksidan 1
A ₂	Antioksidan 2
A _T	Antioksidan Toplam
C	Sitozin
G	Guanin
M	Molarite
R ²	Korelasyon katsayısı
T	Timin

Kısaltmalar

Açıklama

28DHA	2,8-dihidroksiadenin
2HA	2-hidroksiadenin
46D5FP	4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin
46D5NP	4,6-diamino-5-nitropirimidin
56DHT	5,6-dihidrotimin
56DHU	5,6-dihidrourasil
5FU	5-formilurasil
5H5MH	5-hidroksi-5-metilhidantonin
5HC	5-hidroksisitozin
5HH	5-hidroksihidantonin
5HMC	5-hidroksimetilsitozin
5HMU	5-hidroksimetilurasil
5HU	5-hidroksiurasil
8-OHG	8-hidroksiguanin
8HA	8-hidroksiadenin
8OHG	8-hidroksiguanin
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Alx	Allakson
ANOVA	Varyans analizi
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid
DF	Serbestlik derecesi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EKK	En küçük kareler
FG	2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
FRAP	Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC-MS/MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometri/KütleSpektrometri
HPLC-DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diod Serili Dedektör
KA	Kafeik asit

LOD	Tespit Sınırı
MS	Ortalamaların karesi
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RA	Rosmarinik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SIM	Seçili iyon izleme
SRM	Seçilmiş reaksiyon görüntüleme
SS	Karelerin toplamı
TCMS	Trimetilklorosilan
TE	Troloks eşdeğeri
TEAC	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
TG	Timin glikol
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
UV-GB	Ultraviyole/Görünür bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fenolün kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. Gıdalardaki fenolik asitler	4
Şekil 2.3. Temel flavonoid yapısı ve flavonoid türleri	5
Şekil 2.4. İzoflavonlar	6
Şekil 2.5. Flavonoidlerin antioksidan aktivite-yapı ilişkisi.....	10
Şekil 2.6. Eser metaller için bağlanma yerleri.....	11
Şekil 2.7. ABTS reaksiyonu	13
Şekil 2.8. FRAP Reaksiyonu	14
Şekil 2.9. Fe ³⁺ ve Cu ²⁺ varlığında fenoliklerin prooksidan aktivite mekanizması ..	17
Şekil 2.10. Prooksidan potansiyeli olan polifenollerin kimyasal yapıları.....	24
Şekil 2.11. Flavonoidlerde yapı-prooksidan aktivite ilişkisi.....	27
Şekil 2.12. Prooksidan potansiyele sahip antosiyaninlerin kimyasal yapıları.....	28
Şekil 2.13. DNA’da bulunan pürin ve pirimidin yapısındaki bazlar	32
Şekil 2.14. DNA bazlarının oksidatif hasar ürünleri	34
Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan fenolik maddeler	44
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafikleri	50
Şekil 4.2. Antioksidan kapasite için yanıt yüzey grafiği.....	51
Şekil 4.3. Folin-Ciocalteu yöntemi reaksiyonu	53
Şekil 4.4. Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri.....	56
Şekil 4.5. Folin-ciocalteu optimum koşullarında Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri	57
Şekil 4.6. FRAP optimum koşullarında Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Cihazlar ve kullanım amaçları	38
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar	39
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar (devamı)	40
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler	40
Çizelge 3.4. Folin-Ciocalteu yöntemi kalibrasyon verileri	43
Çizelge 3.5. FRAP yöntemi kalibrasyon verileri	43
Çizelge 3.6. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri (kafeik asit (KA), rosmarinik asit (RA) ve gallik asit (GA))	44
Çizelge 3.7. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu	45
Çizelge 3.8. GC-MS/MS cihazı çalışma koşulları	46
Çizelge 3.9. GC-MS/MS cihazı için sıcaklık programı	46
Çizelge 3.10. DNA oksidasyonu için çözeltiler	47
Çizelge 4.1. Kemometrik deneysel ve tahmini değerler	48
Çizelge 4.2. Kemometrik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları	49
Çizelge 4.3. Önemli parametrelere göre oluşturulan model denklemleri	49
Çizelge 4.4. Merkezi kompozit dizayn için optimum koşullar	52
Çizelge 4.5. Antioksidanların sinerjistik/antagonistik etkisi	52
Çizelge 4.6. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin validasyon parametreleri (Aybastier, 2016).	55
Çizelge 4.7. Fenton reaksiyonu ortamında oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)	59

1. GİRİŞ

İnsan uygarlığının hızla gelişmesi, ekonomik büyüme ve sanayileşmiş ülkelerdeki yaşam standardının yükselmesi, çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmıştır. X-ışınları, ozon, sigara, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallara maruz kalmanın insan vücudunda serbest radikal oluşumunu arttıracığı bildirilmiştir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı, oldukça kararsız ve yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller oluşumu ile sonuçlanır. Bu serbest radikaller diğer moleküllerden elektron alabilir ya da verebilir, dolayısıyla oksidan ya da prooksidan olarak davranabilirler. Birçok hastalıkta rol oynayan, oksijen içeren serbest radikallerin en önemlileri; hidroksil, süperoksit anyon, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipoklorit, nitrik oksit ve peroksinitrit radikalleridir. Bu yüksek reaktif türler, DNA, proteinler, karbohidratlar ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli moleküllere çekirdekte ve hücre zarlarında zarar verebilirler. Bununla birlikte, normal şartlar altında, vücut serbest radikallerle başa çıkmak için bir dizi koruyucu mekanizmaya sahiptir. Ancak vücudun antioksidan savunma sistemleri mevcut/yeterli değilse veya serbest radikal üretimi aşırı hale gelirse, hasar meydana gelebilir.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS-reactive oxygen species) neden olduğu oksidasyonu önleyen ve serbest radikalleri temizleme özelliğine sahip bileşiklerdir. Bu özelliklerinden dolayı antioksidanlar, ROS'un neden olduğu çok çeşitli hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Tsao, 2010). Fenolik bileşikler *in vitro* olarak güçlü antioksidanlar olarak kabul edilmiştir. Fenolik bileşiklerin hücresel oksidatif hasarı engelleyebildiği gösterilmiştir. Fenolik bileşikler (flavonoidler ve polifenolik bileşikler) bitkilerde yaygın olarak bulunan ikincil metabolit türleridir. Bu bileşikler bitkilerin büyümesinde ve çoğalmasında önemli bir rol oynarlar, patojenlere ve radikallere karşı koruma sağlarlar.

Antioksidanlar, oksidatif stresi azaltabilir ve ROS'u doğrudan önleyerek hücresel hasarı önleyebilir (Halliwell, 2006). Bu düşük molekül ağırlıklı moleküller, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve hayati moleküller zarar görmeden önce radikal zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Vücutta serbest radikalleri temizleyebilen çeşitli enzimatik antioksidanlar bulunsa da temel antioksidanlar beslenmeden elde edilir.

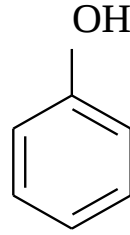
Antioksidanların radikal temizleyici, hidrojen verici, elektron verici, peroksit ayrıştırıcı, singlet oksijen söndürücü, enzim inhibitörü, sinerjist ve ROS'u önlemek için metal şelatlayıcı ajanlar olarak hareket edebildikleri yaygın olarak bildirilmektedir.

Fenolik bileşiklerin radikal süpürücü özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal, antifungal, anti-inflamatuar, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip oldukları *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir (Ferguson, 2001). Fenolik bileşikler; çiftler halinde karıştırıldıklarında sinerjistik, ilave (additive) ve antagonistik etkiler gösterirler (Tsao, 2015). Antioksidan polifenollerin sinerjistik etkileri sadece biyolojik sistemlerde oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması olmakla kalmaz, aşırı miktarlarda bulunması prooksidan etki de yaratabilir. Bu amaçla tez çalışmasında gıdalarda bulunan temel fenolik bileşiklerden üç tanesi (kafeik asit, gallik asit ve rosmarinik asit) seçilmiştir. Farklı derişimlerde bu fenolik bileşikleri içerecek şekilde merkezi kompozit dizayn yardımıyla hazırlanan sentetik çözeltilerin sinerjistik antioksidan özellikleri tayin edilmiştir. Daha sonra belirlenen optimum sinerjistik antioksidan değerine sahip fenolik bileşik derişimlerinin, DNA oksidasyonu önleme kabiliyeti üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Polifenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler veya polifenoller, yaklaşık 9000 farklı fenolik yapı ile bitkilerde bulunan bileşiklerdir (Wang vd., 2018). Polifenoller, bitkilerin ikincil metabolit ürünleridir. Kimyasal yapılarıyla ilişkili olarak, bu bileşikler en az bir fenol grubuna sahiptir. Bu fenol grubu, bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren aromatik bir halkadan oluşur. Aromatik halka, fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinde önemli bir rol oynar. Son on yılda antioksidan gücünden dolayı fenolik bileşiklere olan ilgi artmıştır. Polifenolik bileşiklerin serbest radikal temizleme özellikleri; kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve oksidatif stresle ilişkili bozuklukların önlenmesine yardımcı olurlar. Polifenoller, aşırı reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma olarak vitamin ve enzimlerin işlevlerini tamamlayan ve bunlara katkıda bulunan güçlü antioksidanlardır (Cosme vd., 2020).



Şekil 2.1. Fenolün kimyasal yapısı

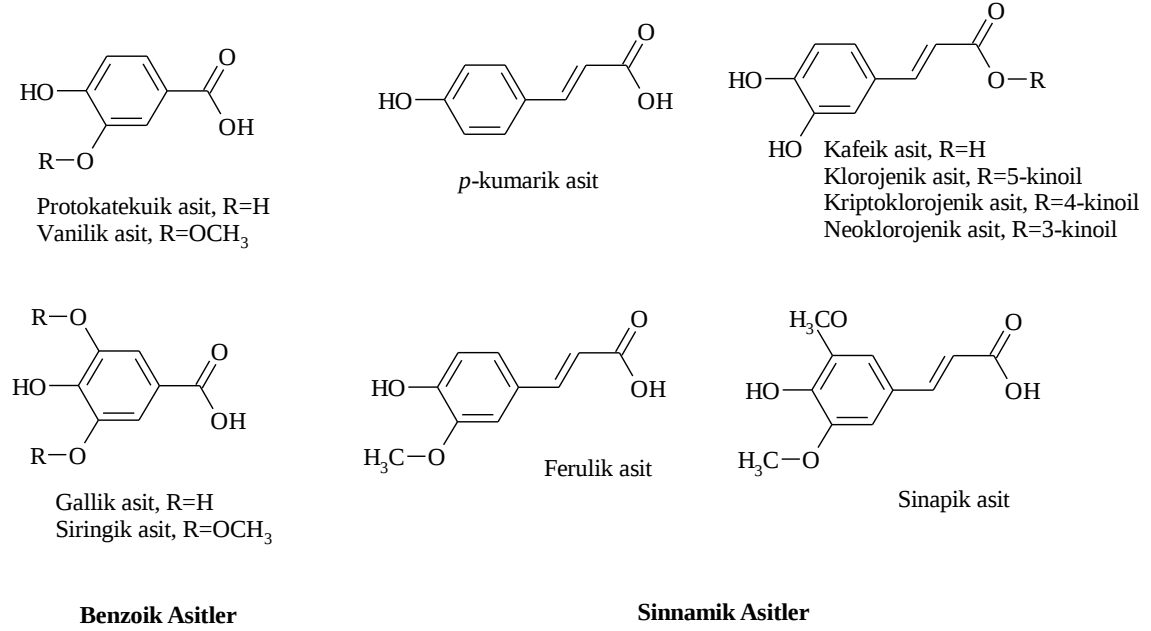
Polifenoller birkaç alt fenolik grubu içermektedirler. Polifenollerin bitkilerdeki çeşitliliği ve dağılımı, bu doğal olarak oluşan bileşiklerin farklı kategorilere ayrılmasına yol açmıştır (Tsao, 2010).

2.2. Polifenollerin Sınıflandırılması

2.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler flavonoid olmayan polifenolik bileşiklerdir ve iki ana türe ayrılırlar. Bu türler benzoik asit ve sinamik asit türevleridir (Şekil 2.2.). Fenolik asitler meyve ve

sebzelerde serbest formda bulunurlar. Fakat tahıllarda ve tohumlarda, özellikle kepek ve kabuk kısmında genellikle bağlı formda bulunurlar (Kim vd., 2006).

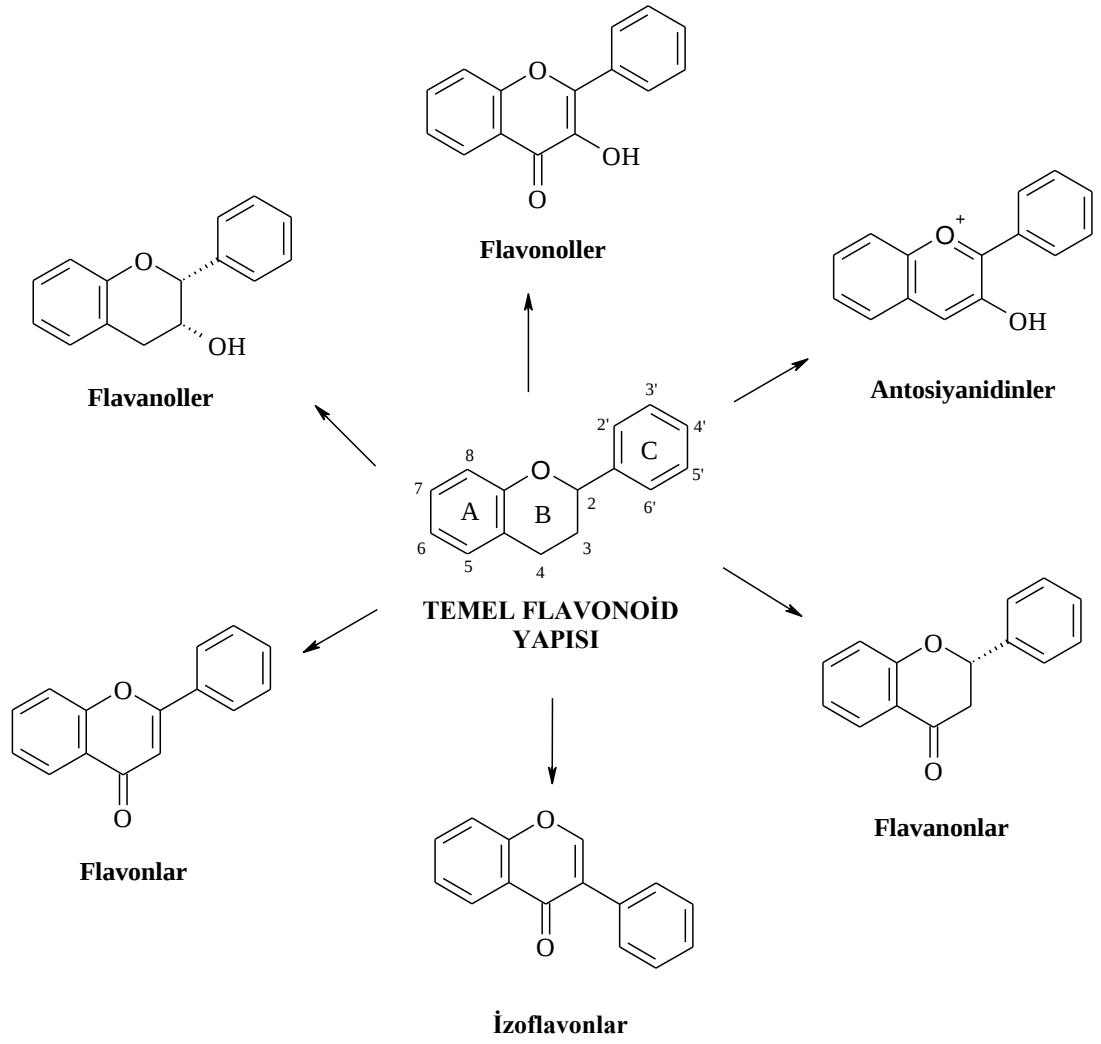


Şekil 2.2. Gıdalardaki fenolik asitler

2.2.2. Flavonoidler

Flavonoidler, fenolik bileşiklerin ana grubunu oluştururlar. Bitkilerdeki mavi, mor, sarı, turuncu ve kırmızı renklerden karotenoidler ve klorofillerle birlikte sorumludurlar. Üç karbon bağıyla birbirine bağlanmış iki aromatik halkalı C₆-C₃-C₆ iskeletine sahiptirler (Şekil 2.3.). Flavonoidler farklı alt gruplara ayrılabilirler: flavonlar, izoflavonlar, flavonoller, antosiyaninler, flavanoller ve flavanonlar. Bu alt grupların arasındaki farklar, hidroksil gruplarının sayısı, konumu ve bunların alkilasyon ve glikosilasyon aralığında oluşan türlerden kaynaklanmaktadır (Tsao, 2010).

Flavonoidler aglikon temel yapısındadırlar, ancak bitkilerde bu bileşikler genellikle glikozit türevi olarak bulunurlar. Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, kimyasal yapısındaki hidroksil gruplarının varlığına, sayısına ve konumuna bağlıdır. Glikozitlerin antioksidan özelliğinin, karşılık gelen aglikon yapısından daha zayıf olduğu, ancak glikozitlerin biyoyararlanımının aglikonlardan daha yüksek olması nedeniyle vücuttaki antioksidan aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir (Heim vd., 2002).



Şekil 2.3. Temel flavonoid yapısı ve flavonoid türleri

2.2.3. Flavonlar ve Flavonoller

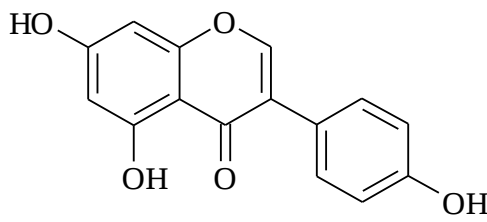
Flavonlar, en temel flavonoid yapıları temsil ederler. Apigenin, luteolin ve bunların glikozitleri meyve ve sebzelerde en çok bulunan flavonlardır. Flavonoller, flavonların 3-hidroksi türevleridir ve meyve/sebzelerde en çok sayıda bulunan flavonoidleri temsil ederler. Bu alt sınıftaki ana bileşikler mirisetin, kuersetin ve kamferoldür. Kiraz, üzüm, kayısı, çikolata ve çeşitli çay türlerinin hepsi flavonol bakımından zengindir (Zhao vd., 2005).

2.2.4. Flavanonlar

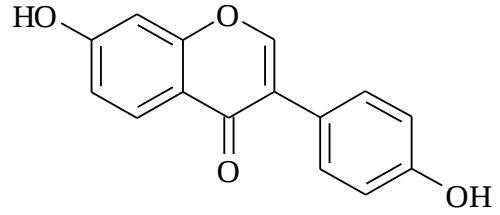
Flavanonlar, çoğunlukla narenciye ürünlerinde bulunup, sınırlı miktarda olmaları nedeniyle en küçük alt sınıfı oluştururlar. Hesperidin, naringenin ve eriodiktiyol bu flavonoid sınıfının örnekleridir. Hesperidin portakal suyunda ekşi tattan sorumludur, naringenin ise daha tatlı bir tada sahiptir (Panche vd., 2016).

2.2.5. İzoflavonlar ve Neoflavonoidler

İzoflavonlar, B halkasının C3 karbonuna bağlı flavonlardır. İzoflavonlar bitkiler aleminde ağırlıklı olarak soya fasulyesi ve diğer baklagillerde bulunur. Genistein ve daidzein ana üyeleridir (Şekil 2.4.) (Mazur vd., 1998). Genistein ve daidzein gibi izoflavonlar, belirli hayvan modellerinde östrojenik aktiviteleri nedeniyle yaygın olarak fitoöstrojenler olarak kabul edilmektedir (Szkudelska ve Nogowski, 2007).



Genistein



Daidzein

Şekil 2.4. İzoflavonlar

Neoflavonoidler genellikle bitkilerde bulunmaz, ancak dalbergin bitkiler aleminde en yaygın ve nispeten geniş dağılım gösteren neoflavondur (Garazd vd., 2003).

2.2.6. Kalkonlar

Kalkonlar ve dihidrokalkonlar, bitkilerdeki biyosentez reaksiyonunda ara ürün oldukları için flavonoidler grubu olarak düşünülebilir. Temel flavonoid iskelet yapısında “C halkasının” bulunmaması ile karakterize edilirler. Bu nedenle, açık zincirli flavonoidler olarak da adlandırılabilirler. Açık zincirli kalkonlar, elma ve şerbetçi otu meyvesi gibi meyvelerde bulunur (Hertog vd., 1993).

2.2.7. Flavanoller

Flavanoller veya flavan-3-ol'ler genellikle kateşinler olarak adlandırılırlar. Çoğu flavonoid yapısından farklı olarak, C2-C3 karbonu arasında çift bağ yoktur ve ayrıca flavanollerin C halkasında bulunan C4 karbonunda da karbonil grubu yoktur. Flavanoller, karmaşık bir alt sınıf içerirler ve bunlar arasında kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, bunların 3-O-gallatları, polimerleri ve oligomerleri en baskın bileşiklerdir. Flavanoller birçok meyvede, özellikle üzüm, elma ve yaban mersini kabuğunda bulunur (Tsao vd., 2003). Flavanoller, gıdalardaki burukluğa, acılığa, ekşiliğe, aroma ve renk oluşumuna katkıda bulunurlar (Si vd., 2006).

2.2.8. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, meyvelerin ve sebzelerin çoğunda, bazı özel tahıl türlerinde (örneğin siyah pirinç) ve çiçek yapraklarında bulunan kırmızı, mavi ve mor pigmentlerin ana bileşenleridir. En yaygın olan antosiyanidinler; siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin ve peonidindir. Antosiyaninlerin rengi ortamın pH'ına bağlı olup asidik koşullarda kırmızı ve bazik koşullarda mavidir (McCallum vd., 2007).

2.2.9. Diğer Polifenoller

Fenolik asitler ve flavonoidlere ek olarak, insan sağlığı için önemli olduğu düşünülen gıdalarda bulunan birkaç flavonoid olmayan polifenol vardır. Bunlar arasında resveratrol (üzüm), ellagik asit ve türevleri (çilek, ahududu ve farklı ağaç yemiş kabukları) bulunur. Kurkumin, zerdeçaldan elde edilen güçlü bir antioksidandır (Tsao, 2010).

2.3. Fenolik Bileşiklerin Biyolojik Etkileri

İnsan sağlığı açısından önemli biyolojik etkileri nedeniyle fenolik bileşikler son zamanlarda önemli araştırma konularından biri olmuştur. Fenolik bileşiklerin önemli biyolojik etkileri hem doğrudan hem de dolaylı olarak antioksidan özellikleri ile ilişkilidir. Polifenoller, oksidan türlere elektron verebilir, serbest radikalleri temizleyebilir ve metal iyonlarını şelatlayabilir. Aynı zamanda antioksidan enzim

aktivitesini geliştirerek ve prooksidan etkileri indükleyen enzimleri inhibe ederek dolaylı olarak reaktif oksijen türlerinin üretimini zayıflatabilir (Cosme vd., 2020).

2.4. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan-Prooksidan Dengesi

2.4.1. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri

Polifenollerin insan sağlığında önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Polifenoller açısından zengin meyve, sebze ve tam tahıl ürünlerinin vücuda yüksek alımı, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, bazı dejeneratif ve kronik inflamasyonlar dahil olmak üzere birçok kronik hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Son çalışmalar, bu hastalıkların çoğunun reaktif oksijen ve nitrojen türlerinden kaynaklanan oksidatif stresle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Rice-Evans vd., 1997).

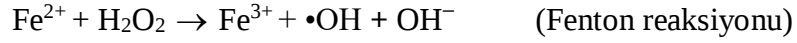
Antioksidanlar; protein, lipid, DNA vb. gibi yükseltgenebilen bir substratın oksidasyonunu geciktirebilen ya da engelleyebilen maddelerdir. Polifenoller, bir elektron veya hidrojen atomu vererek serbest radikalleri nötralize edebilen güçlü antioksidanlardır. Polifenollerde bulunan konjuge sistem ve 3-hidroksi grubu gibi belirli hidroksilasyon modelleri, antioksidan özellik için yapıya büyük katkılar sağlamaktadır (Rice-Evans vd., 1997).

Bir antioksidan maddenin aktivitesi:

1. Bir hidrojen veya elektron veren bileşik olarak reaktivitesi (indirgeme potansiyeli ile ilgilidir),
2. Elde edilen antioksidan kaynaklı radikal, eşleşmemiş elektronu stabilize ve delokalize etme yeteneği,
3. Diğer antioksidanlarla reaktivitesi,
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli ile belirlenir (Apak vd., 2005).

Polifenoller, serbest radikallerin oluşumunu baskırlar, böylece serbest radikallerin aktif türlerinin ve öncüllerinin oluşumunu inhibe ederek oksidasyon oranını azaltırlar (Eghbaliferiz ve Iranshahi, 2016).

Ayrıca polifenoller metaller için şelat olarak da görev yaparlar. Şelat olarak polifenollerin Fe^{2+} gibi geçiş metalleri ile kompleks oluşturması, doğrudan Fenton reaksiyonunun hızını azaltabilir, böylece yüksek reaktif hidroksil radikallerinin neden olduğu oksidasyonu önleyebilir.



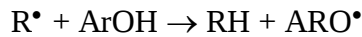
Bununla birlikte, belirli koşullar altında (yüksek fenolik antioksidan derişimleri, yüksek pH, demir varlığı), fenolik antioksidanlar bir otooksidasyon sürecini başlatabilir ve prooksidan özelliklere neden olabilirler (Eghbaliferiz ve Iransahi, 2016).

2.4.2. Fenolik Bileşiklerin Yapısı ve Antioksidan Aktivitesi Arasındaki İlişkiler

Fenolik bileşikler güçlü antioksidanlar olup, serbest radikal reaksiyonlarını önleyerek biyomoleküllerin (nükleik asitler, proteinler, çoklu doymamış lipidler ve şekerler) oksidatif hasara uğramasını önleyen bileşiklerdir (Heleno vd., 2015). Bu bileşiklerin antiinflamatuvar, antidiyabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antitümör ve antiyaşlanma gibi yararlı etkileri bulunmaktadır (Zhang vd., 2018).

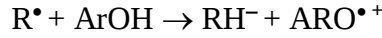
Antioksidanların bu özellikleri yerine getirmesi sağlayan iki ana mekanizma vardır: serbest radikal inaktivasyonu ve elektron transferi.

Birinci mekanizmada, serbest radikal ($R^\bullet$), radikal hale gelen antioksidandan ($ArOH$) bir hidrojen atomu çıkarabilir. O-H bağlarının bağ ayrışma enerjisi zayıf olduğundan, serbest radikalın inaktivasyon reaksiyonu kolay olur ve dolayısıyla antioksidan etki de o kadar büyük olur.



İkinci mekanizmada; antioksidan, bir katyon radikali haline gelen serbest radikale bir elektron verebilir. Bu mekanizmada, potansiyel iyonizasyon ne kadar düşük olursa,

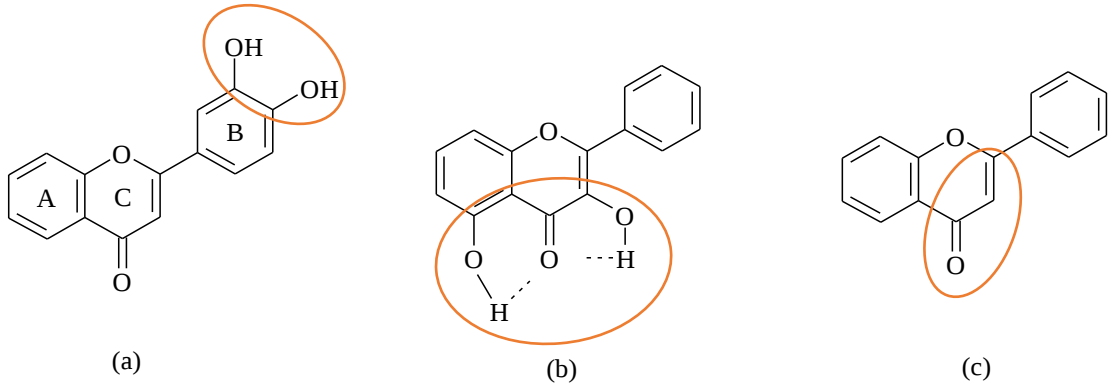
elektron vermesi o kadar kolay olur, bu da daha fazla antioksidan aktivite anlamına gelir.



Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, hidroksil gruplarının (OH) sayısı ve pozisyonları, çift bağın varlığı (C2=C3), glikosilasyon, halkalardaki süstituentlerin varlığı, bileşiğin türü, metoksilasyon derecesi de dahil olmak üzere yapı-aktivite ilişkisi ile belirlenir (Yordi vd., 2012).

Antioksidan aktivite ile ilişkilendirilen yapısal özellikler şunlardır (Şekil 2.5.):

1. Serbest radikali yakalama reaksiyonundan sonra oluşan radikale yüksek stabilite kazandıran B halkası üzerinde bulunan bir kateşol grubu,
2. 3 ve 5 konumundaki hidroksil gruplarının varlığı,
3. C-halkasındaki karbonil grubunun 4-oksi fonksiyonel grubu ile 2,3-çift bağın konjügasyonu (Yordi vd., 2012).

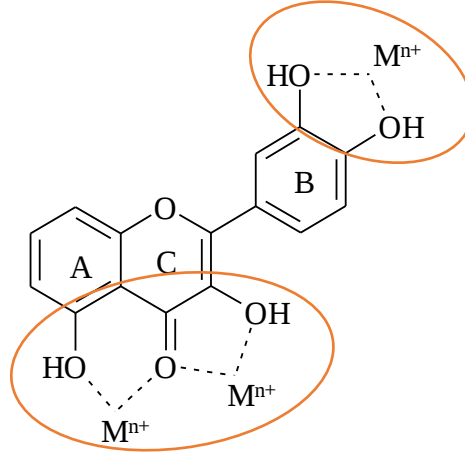


Şekil 2.5. Flavonoidlerin antioksidan aktivite-yapı ilişkisi

Metal şelatlama eğilimi, özellikle demir ve bakır gibi geçiş metali katalizli serbest radikal oluşumunu engelleme açısından polifenollerin önleyici antioksidanlar olarak rolünü destekler (Bravo, 1998).

Metal şelasyonu için, geçiş metal iyonlarının flavonoid molekülüne bağlanmasının iki noktası vardır (Şekil 2.6.):

- B halkasının 3,4-dihidroksi pozisyonlarındaki o-difenolik gruplar,
- Flavonollerin C halkasında ketol yapıları; 4-keto, 3-hidroksi veya 4-keto ve 5-hidroksidir (Pietta, 2000).



Şekil 2.6. Eser metaller için bağlanma yerleri

Yarı indirgenme potansiyeli, flavonoidlerin radikal süpürme aktivitesini temsil etmek için uygun bir parametre olarak da tanımlanmıştır.

2.4.3. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özelliğini Tayin Yöntemleri

Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğini tayin etmek için kullanılan en yaygın *in vitro* yöntemler, tek elektron transfer reaksiyonuna veya hidrojen atomu transfer reaksiyonuna dayanır. Tek elektron transfer reaksiyonu, antioksidan derişim değerlerine bağlı olarak renk dönüşümü/oluşumu sunan redoks reaksiyonlarıdır (Youssef vd., 2014).

Elektron transferine dayanan yöntemler arasında;

- Bakır (II) indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi,
- Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (ABTS veya TEAC) yöntemi,
- Fe (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemi ve
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi bulunur (Benzie ve Strain, 1996).

Hidrojen atomu transfer reaksiyonu, peroksil radikali tarafından substratlar ve antioksidanlar arasındaki termodinamik rekabete dayanan reaksiyondur. Hidrojen atomu transfer reaksiyonuna dayanan yöntemler arasında;

- Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC) yöntemi ve
- Toplam peroksil radikali yakalama antioksidan parametresi (TRAP) yöntemi bulunur.

Fenolik bileşikler, organizmalarda, sindirim ve emilim nedeniyle çok sayıda biyokimyasal reaksiyondan geçer. Bu da fenolik bileşiklerin ve bitki ekstraktlarının *in vitro* çalışmalarda yüksek antioksidan özellik gösterirken *in vivo* çalışmalarda düşük antioksidan özellik göstermesini açıklar. Fenolik bileşikleri *in vitro* antioksidan aktivite yöntemleri, tüm reaktif oksijen türlerine değil, yalnızca bir radikale karşı antioksidan aktiviteyi ölçer. Oysaki *in vivo* çalışmalarda durum böyle değildir, biyokimyasal, metabolik ve diğer fizyolojik parametrelerde düşünülmelidir.

Elektron Transferine Dayanan Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

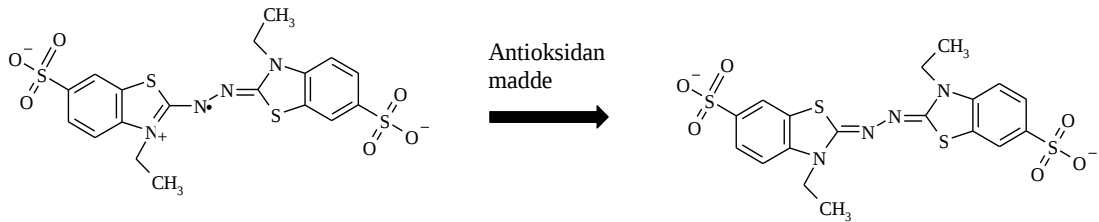
Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Bu yöntem, kromojenik oksitleyici ajan olarak bakır (II) neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifinin uygulanmasına dayanmaktadır. Antioksidanların varlığında bakır (II)-neokuproin kompleksi, bakır (I)-neokuproin kompleksine indirgenir ve UV-GB spektrofotometresinde 450 nm’de ölçümü alınır. Sonuçlar, troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) eşdeğeri olarak sunulur. Fenolik bileşikler, bakır (II) neokuproin kompleksi ile reaksiyona girerek kinon yapısına dönüşürler. CUPRAC yöntemi, tiyol tipi antioksidanları oksitleyebilir, fakat şekerleri ve sitrik asidi okside etmez. Ayrıca, bu yöntem aynı anda hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanları ölçebilir (Apak vd., 2005).

Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (ABTS ya da TEAC) Yöntemi

ABTS yöntemi ilk olarak 1993'te Miller ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yöntem, toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için $ABTS^+$ radikal katyonunun absorbansına dayalı olarak geliştirilmiştir (Şekil 2.7.). Bu yöntem ilk olarak, ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] varlığında metmiyoglobinin hidrojen peroksit ile aktivasyonu yoluyla, ABTS radikal katyonunun antioksidanlarla veya antioksidanlar olmadan oluşmasına dayanmaktadır. Daha sonra antioksidanlar, $ABTS^+$ radikali [2,2-azino-bis (etilbenzen-tiazolin-6-sülfonik asit)] ile reaksiyona girerek, $ABTS^+$ radikalinin miktarında azalmaya (dolayısıyla absorbansta azalma) neden olmaktadır. $ABTS^+$ radikali; 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sülfonik asit aracılığı ile üretilir. Bu radikal, geniş bir pH aralığına sahip, suda çözünür ve 600-750 nm aralığında güçlü absorpsiyon sergileyen, kimyasal olarak kararlı bir kromofor bileşiğidir. $ABTS^+$ radikali sulu ve organik ortamda çözünür, bu nedenle antioksidan aktivite suda ve yağda çözünür örneklerde belirlenebilir. Bununla birlikte, antioksidanlar da ABTS ile reaksiyona girerek katyon radikali oluşturabilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir (Miller vd., 1993).

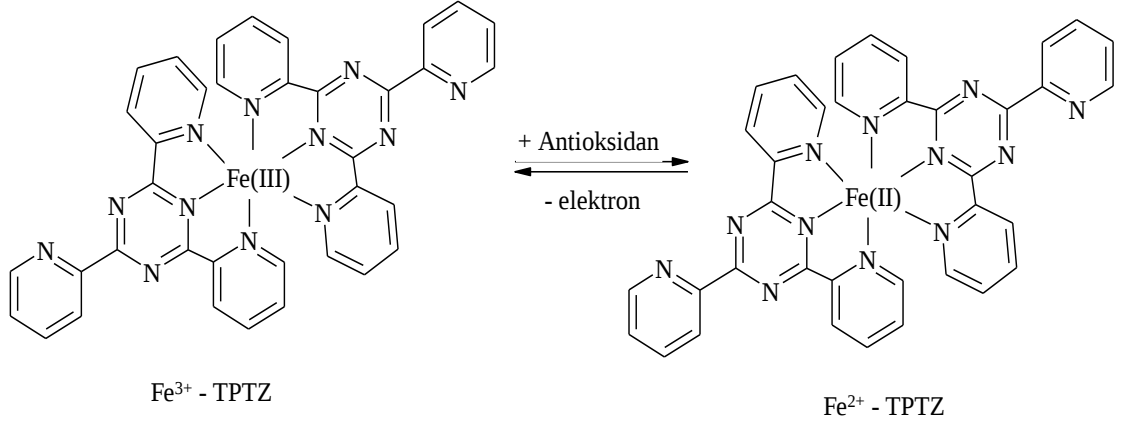
ABTS radikallerini elde etmenin başka yolları da önerilmiştir. ABTS ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon ile mavi/yeşil renkte $ABTS^+$ kromofor doğrudan üretilebilir. Böylece radikal antioksidanlarla reaksiyona girmeden önce doğrudan kararlı bir formda üretilmiş olur. Bir standart olarak Troloks ile $ABTS^+$ radikalinin reaksiyonu sonucu, $ABTS^+$ radikalinin absorbans değerindeki azalma ölçülerek $ABTS^+$ radikal katyonunun yüzde inhibisyonu belirlenir (Nenadis vd., 2004).



Şekil 2.7. ABTS reaksiyonu

Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi

Bu yöntem, demir (III)'ün demir (II)'ye indirgenmesi ile antioksidanların toplam miktar tayinini içerir ve düşük pH'ta (pH 3,6) iyonlar, renkli bir kompleks oluşumu gerçekleştirir. Demir (III)-tripiridiltiazin (TPTZ) sarı bir renge sahiptir ve antioksidanlar tarafından demir (II)'ye indirgenir (Şekil 2.8.). 593 nm dalga boyunda gösterdiği maksimum absorpsiyon ile mor/mavi renkli kompleks oluşur (Antolovich vd., 2002). FRAP yönteminde sistemde bir radikal yoktur, bu da farklı radikal türlerine karşı antioksidan gücü karşılaştırmada sorun yaratır (Roginsky ve Lissi, 2005).



Şekil 2.8. FRAP Reaksiyonu

2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Yakalama Kapasitesi Yöntemi

DPPH yöntemi ilk olarak 1950'lerde doğal ürünlerde elektron verici bileşikleri belirlemek için önerilmiştir (Blois, 1958). Daha sonra fenolik bileşiklerin ve bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için kullanılmıştır (Mensor vd., 2001). Mor renkli ve 515–520 nm aralığında maksimum absorpsiyon gösteren DPPH radikali, hidrojen donörlerle etkileştiği zaman hidrazine indirgenir. DPPH radikal çözeltisine antioksidan ilave edildiğinde absorbansta düşüş gözlenir ve radikalın rengi mor renkten sarı renge döner. Antioksidan aktivite, diğer antioksidan deneylerinde kullanıldığı gibi troloks eşdeğeri olarak ifade edilir (Bondet vd., 1997). Radikalın ticari olarak temin edilebilmesi, kullanımına olanak sağlamaktadır.

Hidrojen Transferine Dayanan Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

ORAC yöntemi, Cao ve Prior (1999) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, yüksek oranda floresan özellik gösteren bir protein olan B veya R fikoeritrinin kullanılmasına dayanmaktadır. Bu protein kırmızı alglerde bulunur. Bu proteinler yüksek absorpsiyon katsayısına sahiptir ve 10^{-12} M kadar düşük derişimlerde floresan spektroskopisi ile kolayca tespit edilebilir. Peroksil radikali (ROO•), 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorürün (AAPH) 37°C'de termal ayrışması yoluyla üretilir (Cao ve Prior, 1999). Daha sonra, fikoeritrinin sabit bir oranda peroksil serbest radikallerine maruz kalması floresan emisyonunda doğrusal bir azalmaya yol açar. Floresans miktarındaki azalma, analizdeki toplam antioksidan aktivite ile ilişkilendirilir. Troloks standart olarak kullanılır. Peroksil, insan vücudunda biyolojik olarak en önemli/bol olan ve oksidatif hasardan sorumlu bir reaktif oksijen türüdür. Peroksil radikali kullanan ORAC, insan vücudunda bulunmayan radikalleri kullanan diğer yöntemlere göre daha gerçekçi bir yöntemdir (Cao ve Prior, 1999).

Toplam Radikal Tutma Antioksidan Parametresi (TRAP) Yöntemi

Toplam radikal tutma antioksidan parametresi (TRAP) tayini, 37°C'de 2,2'-azobis(amidinopropan) dihidroklorürün (AAPH) termal ayrışması peroksil radikal üretimine yol açtığından, antioksidanın üretilen bu peroksil radikalini yakalama kapasitesine dayanır (DeLange ve Glazer, 1989). R-fikoeritrinin floresansının korunması, numune sisteme eklendiğinde antioksidan potansiyeli ile ilişkilidir. Antioksidanlar, R-fikoeritrinin ayrışmasını engeller ve böylece floresandaki azalmayı geciktirir. Floresans bozunmada bir düzenliliğe ulaştığında ölçüm durdurulur. Fikoeritrin söndürme kinetiği, peroksil veya hidroksil radikallerinin varlığında doğrusal değildir. Daha sonra, floresan miktarının belirlenmesi için, antioksidan kapasite ile ters orantılı olan eğri altındaki alan (AUC) kullanılır (Ghiselli vd., 1995).

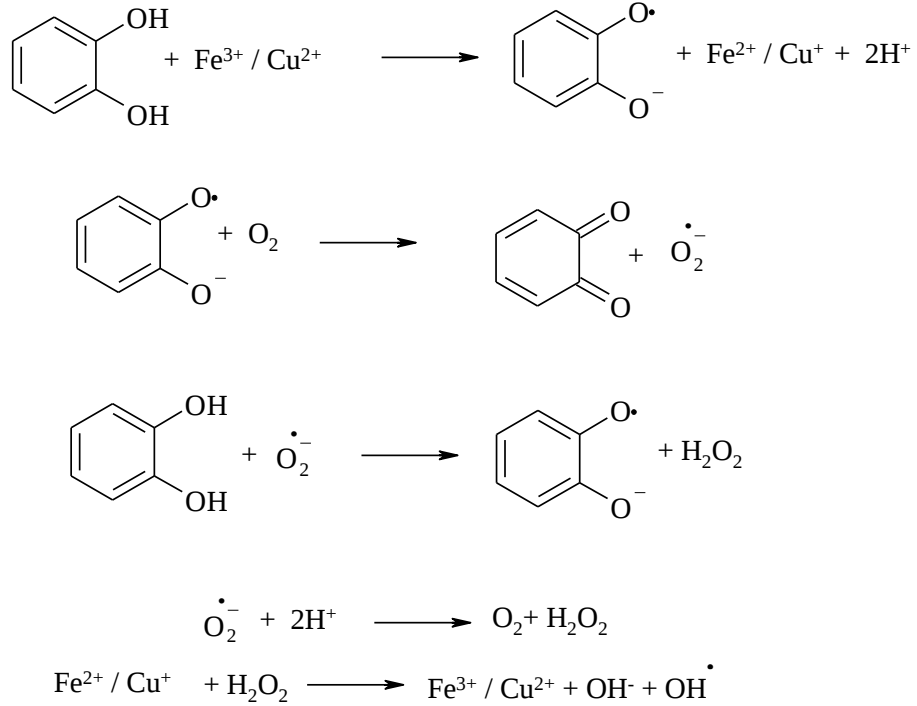
Dolaylı yöntemlere yönelik en büyük eleştirilerden biri, elde edilen indirgeme kapasitesinin numunelerin antioksidan aktivitesini tamamen yansıtmamasıdır. Bu tür yöntemler gerçek bir oksidatif bozunmayı dikkate almaz (Amorati ve Valgimigli, 2015). Ayrıca, *in vivo* araştırmalarda antioksidan aktivite doğrulaması azdır veya bulunmaz, diğer bir deyişle, *in vitro* testlerden elde edilen sonuçlar *in vivo* testlerle doğrulanmamıştır (Alam vd., 2013; Cao ve Prior, 1999).

2.4.4. Fenolik Bileşiklerin Prooksidan Özelliği

Fenolik bileşiklerin doğrudan prooksidan aktiviteleri, bir geçiş metali iyonu ile bir fenoksil radikalının veya bir redoks kompleksinin üretilmesine dayanır. Fenoksil radikalleri oksijenle reaksiyona girerek O_2 , H_2O_2 ve semikinonlar ile kinonların kompleks bir kombinasyonunu oluşturabilir. Çok sayıda fenolik bileşiğin prooksidan aktivitesinin, normal ve kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve apoptozu etkileyebileceği varsayılmaktadır (Zheng vd., 2008). Bununla birlikte, prooksidan bileşiklerin, normal hücrelerde değil, kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin hücresel seviyelerini sitotoksik seviyelere yükselttiğine dikkat edilmelidir. Bu etki, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde bulunan daha yüksek bakır iyonu derişimi ve daha büyük metabolik aktivite ile açıklanabilir. Belirli bir doğal ürünün prooksidan aktivitesi, sitotoksik ürünlerin oluşmasına sebep olsa da bileşiğin seçici antikanser etkiden sorumlu olabileceğini belirtmek önemlidir. Bu nedenle, antioksidan bileşiklerin prooksidan özelliği, biyolojik sistemler için her zaman zararlı değildir ve çeşitli kanserler için yüksek dozlarda C vitamini kullanımının gösterdiği gibi, kanseri tedavi etmek için terapötik olarak kullanılabilir (Chen vd., 2008).

Hemen hemen tüm bitkiler antioksidan bileşikler içerir. Fenolik bileşikler özellikle bakır ve demir gibi metallerin varlığında prooksidan aktivite gösterebilir. Demir, insan vücudunda en bol bulunan önemli geçiş metali iyonlarından biridir ve biyolojik sistemlerde ana rol oynar. Demir, birçok proteinde oksijen taşınması, elektron taşınması ve oksidoredüktaz reaksiyonlarında bir katalizör olarak kullanılmaktadır. Canlı bir hücrede fazla miktarda demir (III) iyonu, DNA'ya, lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilen fenton reaksiyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize edebilir (Whited vd., 2009). Bakır vücut için gerekli bir mikro elementtir.

Çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda ve biyokimyasal reaksiyonlarda hayati bir role sahiptir. Bakır-demir metabolizması için gerekli olan birçok enzimin parçasıdır. Gerekli olmasına rağmen, bakırın aşırı yüklenmesi zararlı olabilir ve büyüme geriliğini, histolojik değişikliği ve oksidatif stresi tetikleyebilir.



Şekil 2.9. Fe^{3+} ve Cu^{2+} varlığında fenoliklerin prooksidan aktivite mekanizması

Çinko, canlı sistemlerde esas olarak biyolojik rolleri olan, önemli bir mikro besin maddesidir. Daha yüksek oksidasyon durumu dışında, çinko Zn^{2+} formunda bulunabilir. Çinko, antioksidan özelliklerini doğrudan reaktif oksijen türlerini temizleme yoluyla göstermez. Bunun yerine aktivitelerini dolaylı bir şekilde göstermeyi tercih eder. Çinko, H_2O_2 'den $\text{OH}^\bullet$ 'yi indirgeyerek metal katalizli protein/lipid oksidasyonunu önleyebilir. Çinko antioksidan enzimlerin yapısında bulunmasına rağmen aşırı dozları prooksidan aktivitelerle sonuçlanabilir (Ahmadi vd., 2008).

Mangan insan ve hayvanlar için önemli bir eser elementtir ve derişimine bağlı olarak koruyucu/toksik etkileri olabilir. Mangan çeşitli yükseltgenme basamaklarına sahip olması nedeni ile farklı prooksidan ve antioksidan etkilere sahip olabilir. Mangan bileşikleri (+5, +6 ve +7) yükseltgenme basamaklarında, güçlü prooksidan bileşiklerdir.

Bununla birlikte, bu yükseltgenme basamaklarına sahip mangan bileşikleri genellikle kararsızdır ve biyolojik sistemlerde daha az yaygındır. Manganın en kararlı oksidasyon durumu (+2)'dir. İki değerlikli iyonun üç değerlikli forma dönüştürülmesi, manganın yükseltgenme yeteneğinde bir artışa yol açarak reaktif oksijen türlerinin üretimi sonucunda, lipid peroksidasyonu ve hücre zarı hasarı oluşur (Chan ve Wong, 2013). Yapılan çalışmalar, düşük emilim oranı ve safra eliminasyonu sırasında karaciğerden hızlı atılımı nedeniyle vücudun manganın öldürücü etkilerinden korunduğunu göstermiştir (Lyle vd., 1998). Bununla birlikte, manganın prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin birçok enziminde bulunduğu dikkat edilmelidir. Mangan içeren enzimler, süperoksit serbest radikalleri dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde hayati öneme sahiptir. Mangana aşırı maruz kalma, nörolojik bir bozukluk olan manganizme yol açar; ancak mangan, nikel ve bakırdan daha az toksiktir. Mangan, antioksidan enzimler tarafından kullanılmasına rağmen, manganın doz aşımı prooksidan aktivitelerle sonuçlanır (Rahman, 2007).

Kadmiyum, krom, kobalt ve nikel dahil olmak üzere tüm geçiş metallerinin değişken yükseltgenme ve indirgeme yetenekleri (prooksidan aktivite) olmasına rağmen, prooksidan aktiviteleri hakkında çok az araştırma yapılmıştır. Biyolojik sistemlerde, özellikle doğal antioksidanların varlığında prooksidan aktiviteleri üzerine hiçbir araştırma yapılmamıştır. Biyolojik sistemlerde yukarıda belirtilen geçiş metallerinin eser miktarları nedeniyle prooksidan aktivitenin ihmal edilebilir olması muhtemeldir. Krom birkaç yükseltgenme basamağına sahiptir (-2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5 ve +6). Krom (III), yiyeceklerde, suda bulunur ve toksik değildir. Buna karşılık, krom (VI), kromun toksik formu olarak kabul edilir ve mutajenik, kanserojenik özelliklere sahiptir. Krom (III)'ün eser element olarak biyolojik sistemler için gerekliliği tartışmalıdır. Bazı bilim adamları krom (III)'ün şeker ve lipid metabolizması için gerekli olduğuna inanırken, diğerleri bunun gereksiz olduğuna inanmaktadır (Shadreck ve Mugadza, 2013). Nikel mikroorganizmalar ve bitkilerde bulunan önemli bir eser elementtir. Üre-hidrolize edici enzim gibi bazı enzimler yapılarında nikel içerir. Diğer geçiş metalleri gibi nikel de farklı oksidasyon durumlarına (0, +1, +2 ve +4) sahiptir. Nikel, böbrekler tarafından idrar yoluyla vücuttan atıldığı için toksik bir madde olmayabilir. Kadmiyumun üç yükseltgenme basamağı vardır (-2, +1 ve +2). Vücutta en yüksek

miktarda kadmiyum böbreklerde tespit edilmiştir. Dandapat ve diğerleri (2003), lipid peroksidasyonunun indüklenmesinde demir, kadmiyum, çinko ve bakırın prooksidan özelliklerini araştırmıştır. Demir (III) ve kadmiyum (II) yapısının lipid peroksidasyonunun en güçlü indükleyicileri olduğunu bulmuşlardır (Dandapat vd., 2003). Kadmiyumun Fenton tipi bir reaksiyon yoluyla reaktif oksijen türlerini arttırdığını ve C6 glioma hücrelerinde oksidatif stresi indüklediği kanıtlanmıştır. Aslında, kadmiyum apoptotik aktivitesini hücre hattında en azından kısmen oksidatif stres yoluyla gösterir (Wätjen ve Beyersmann, 2004).

Kobalt, vücut için temel bir elementtir ve yedi yükseltgenme basamağına sahiptir (-3, -2, +1, +2, +3, +4 ve +5). Kobalt, kobalaminin (B₁₂ vitamini) moleküler yapısının bir parçasıdır. Ayrıca metiyonin ve aminopeptidaz-2 gibi bazı kobaloproteinlerde de bulunur. Kobalt, çok toksik değildir ve LD₅₀'si yaklaşık 50-500 mg/kg'dır (Gupta ve Gupta, 1998).

Diğer metaller ve metaloidler

Arsenik, bir metal değildir ancak metaloid olarak kategorize edilir. Keçi, tavuk ve hamster gibi hayvanlarda eser miktarda arseniğin gerekli olduğuna dair bazı kanıtlar olmasına rağmen, biyolojik sistemlerdeki etki mekanizmaları ve rolleri bugüne kadar açığa çıkartılamamıştır. Ancak arsenik mikroplar, böcekler ve hayvanlar için çok zehirlidir. As₂O₃, kanser hücrelerinde apoptozu indükler (Pevac vd., 2012). Vitamin C, düşük derişimlerde bile (0,14 mM) arsenik varlığında prooksidan rol oynar. Bu derişimde, C vitamini %60 prooksidan aktivite göstermiştir. Vitamin C, arseniğin prooksidan formu olan arsenik (III)'ün arsenik (IV)'e dönüşümünü arttırmıştır. Diğer fenoliklerin arsenik varlığında prooksidan aktivite gösterdiği tahmin edilmektedir; ancak, bu konu daha fazla araştırma gerektirmektedir. Alüminyum, prooksidan aktiviteye sahip başka bir metaldir. Alüminyum, biyolojik sistemlerde doğal olarak mevcut değildir. Suda özellikle Al(OH)₃ formunda çözünmez. Alüminyumun lipid peroksidan aktivitesi çinko ve kadmiyumdan daha yüksektir. Alüminyum bir geçiş metali değildir; bu nedenle doğrudan reaktif oksijen türlerini üretemez (Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla). Ancak alüminyum, demir varlığında prooksidan rol oynar.

Alüminyum, lipid peroksidasyonunu indükleyebilen demir (II) iyonunu stabilize eder (Yoshino vd., 1999).

2.4.5. Polifenollerin Yapısı ve Prooksidan Aktivitesi Arasındaki İlişkiler

Polifenollerin Prooksidan Aktivitesi

Polifenoller, aromatik yapılara sahip ikincil bitki metabolitleridir. Son yıllarda kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bazı insan hastalıklarının önlenmesinde varsayılan rolleri nedeniyle önem kazanmışlardır. Polifenoller; antioksidan, metal şelasyon, serbest radikal temizleme, enzim modülasyonu ve antikanser aktiviteleri gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahiptirler. Bu bileşikler, antioksidan özelliklerinden dolayı düşük derişimli lipoproteinlerin lipid peroksidasyonunu ve oksidatif reaksiyonunu önler.

Polifenollerin kimyasal yapısı da prooksidan aktiviteleri üzerinde etkilidir. Hidroksil gruplarının sayısı ve konumlarından ayrı olarak, C halkasında bir çift bağın varlığı ve sterik engeller flavonoidlerin prooksidan aktivitesi için önemli faktörlerdir (Tomczyk vd., 2010). Çeşitli raporlar, fenolik antioksidanların, yüksek derişimlerde geçiş metal iyonları, alkali pH ve oksijen moleküllerinin varlığı dahil olmak üzere belirli koşullar altında prooksidan olarak hareket edebildiğini göstermiştir. Gallik asit ve kuersetin gibi basitçe oksitlenen küçük polifenoller, prooksidan aktivite sergileyebilir. Bunun tersine, hidrolize edilebilir ve yoğunlaştırılmış tanenler gibi büyük moleküler ağırlıklı fenolikler, çok az prooksidan özelliğe sahiptir (Blokhina vd., 2003).

Hidroksisinnamik asitler prooksidan aktivite gösterir (Şekil 2.10.) ve DNA hasarına neden olurlar. Orto-dihidroksil grupları veya 4-hidroksi-3-metoksi grupları içeren bileşiklerin önemli DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Orto-dihidroksil gruplarına sahip bileşikler, yüksek bir prooksidan aktivite gösterir. Hidroksisinnamik asitler de bakır (II) varlığında DNA hasarına etkili bir şekilde sebep olabilir. Bitki polifenollerinin daha yüksek bakır derişimlerine sahip kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin, polifenollerin apoptozu güçlendiren prooksidan aktivitesiyle ilişkili olması muhtemeldir. Hidroksisinnamik asitler arasında, *p*-kumarik asit en zayıf

prooksidan aktiviteyi gösterirken, rosmarinik asit ve kafeik asit, *p*-kumarik asitten daha yüksek aktivite gösterir. Bununla birlikte, orto pozisyonlarında üç hidroksil grubuna sahip doğal bir benzoik asit türevi olan gallik asit, rosmarinik ve kafeik asitlerden daha yüksek prooksidan aktivite göstermiştir (Azmi vd., 2005).

C vitamini ve E vitamini polifenoller de prooksidan aktivite gösterir. Bakır iyonlarının varlığında prooksidan özellikler gösteren C vitamininin, normal lenfositlerde sitotoksiteyi indükleyen daha düşük bir derişimde lösemik bir hücre hattı için sitotoksik olduğu bildirilmiştir (Kondakçı vd., 2013). İlginç bir şekilde, Chen ve diğerleri (2008) yüksek dozda C vitamininin normal hücreleri olumsuz etkilemeden farelerde tümör büyümesini engellediğini göstermiştir. C vitamini tümör hücrelerinde hidrojen peroksit oluşumu yoluyla oksidatif stresi indükler, ancak kan ve normal hücrelerde indüklemey (Chen vd., 2008).

DNA'ya bağlı bakır (II) iyonu, polifenollerle redoks döngüsü durumunda özellikle zarar verici olabilir. Çünkü bakır (II) iyonu, DNA ve polifenollerle üçlü bir kompleks oluşturabilir ve bakır (I)'e indirgenebilir. Sonuç olarak, bakır (I) iyonu moleküler oksijen tarafından bakır (II)'ye reoksidize edilir, bu da reaktif oksijen türlerini üretir ve DNA hasarına neden olur. Bakır (II) iyonunun, bakır (I) iyonuna indirgenmesi gereklidir, çünkü Fenton tipi reaksiyonlar düşük yükseltgenme durumundaki metalleri gerektirir (Şekil 2.9.). Polifenollerin biyolojik prooksidan etkisinde yer alan protein-bakır kompleksi, redoks döngüsü yoluyla reaktif oksijen türlerini üretir. Örneğin, resveratrol-bakır iyonlarını ve DNA'yı bağlayarak, bakır (II)'nin bakır (I)'e indirgenmesi yoluyla oksijen radikalleri üreten ve DNA hasarına neden olan bir DNA-resveratrol-bakır (II) üçlü kompleksi oluşturabilir. Resveratrol, bakır iyonlarının varlığında prooksidan aktivite gösterir (Ahmad vd., 2005).

Üzümden elde edilen polifenolik bir bileşik olan resveratrol, koroner kalp hastalığı ve kanseri önleyici özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Resveratrol genellikle bir antioksidan olarak kabul edilir; ancak prooksidan aktivitelerini destekleyen bazı kanıtlar da vardır. Bakır (II), resveratrol tarafından bakır (I)'e indirgenir ve bu da oldukça reaktif hidroksil radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini üretir. Hidrojen peroksit, hidroksil

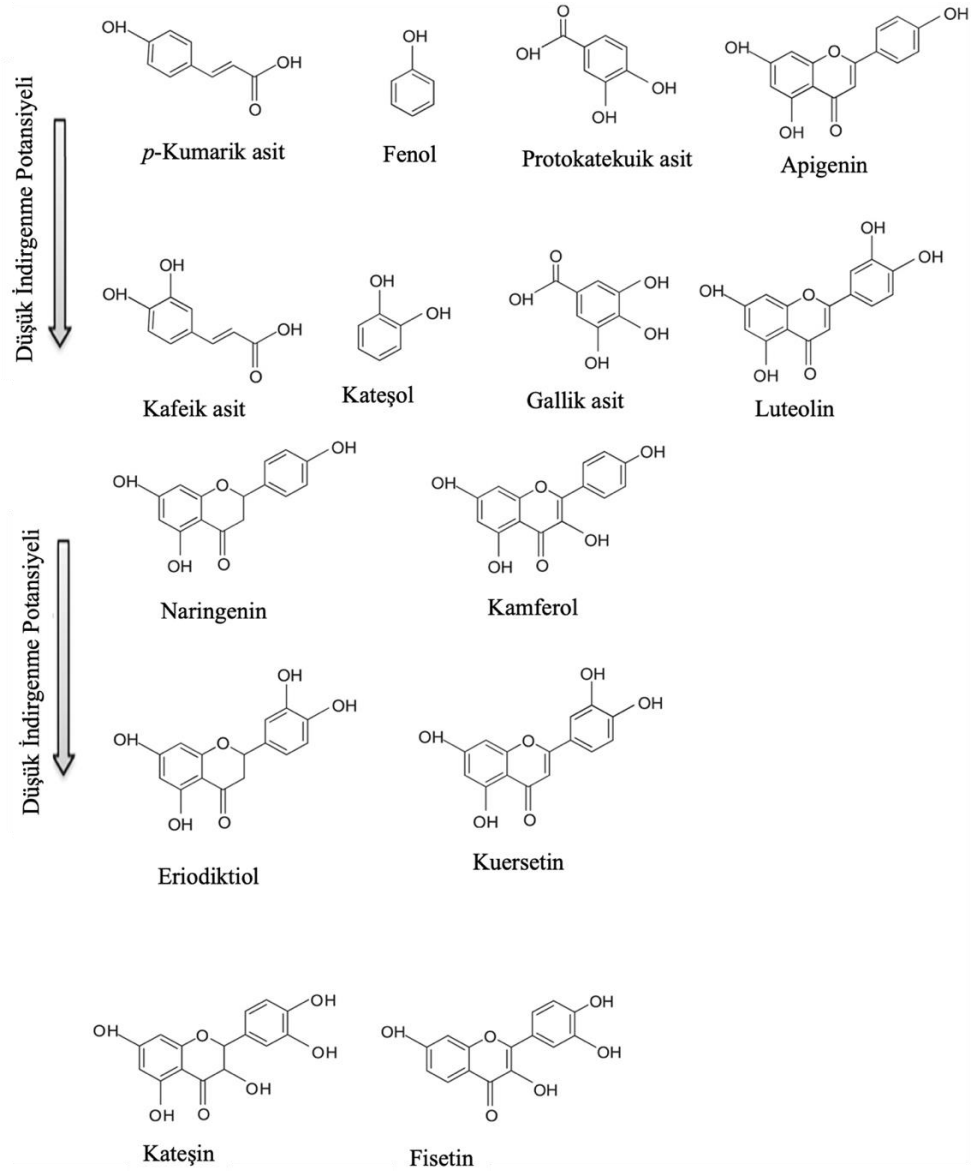
radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri tarafından üretilen DNA hasarı mutajenez, onkogenez ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. Üzümden elde edilen polifenollerin prooksidan aktivitesi de *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışılmıştır (Cotoras vd., 2014). Narenciye kabuğu (Rasmussen vd., 2005), elma ve üzüm posasının (Arts ve Hollman, 2005; Cole vd., 2005), kateşin, kuersetin, kamferol, mirisetin, gallik asit, protokatekuik asit ve *p*-kumarik asit gibi çeşitli polifenoller içerdiği tanımlanmıştır. Üzüm, narenciye, elma ve diğer doğal kaynaklardan elde edilen polifenollerin antioksidan ve prooksidan aktiviteleri döngüsel voltametri yöntemiyle *in vitro* olarak belirlenmiştir (Simić vd., 2007). Ekstraktların prooksidan kapasitesi, fitopatojenik fungus *Botrytis cinerea* model olarak kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, düşük yükseltgenme potansiyeline sahip polifenollerin antioksidan aktivite sergilediğini, yüksek yükseltgenme potansiyeline sahip polifenollerin ise prooksidan olarak hareket ettiğini göstermiştir. Bu özellik fenolik bileşiklerin ikili etkisini tanımlayabilir; bazı ekstraktlarda aynı anda antioksidan ve prooksidan aktiviteler sergileyen yüksek yükseltgenme potansiyeline sahip polifenoller mevcuttur.

Zerdeçaldan elde edilen, iyi bilinen bir antioksidan olan kurkumin, bakır (II) varlığında prooksidan aktivite gösterebilir. Bakıra bağlı DNA hasarına neden olur ve ardından apoptozu indükler (Yoshino vd., 2004). Çalışmalar, kurkuminin bakır (II) iyonunu, bakır (I) iyonuna indirgemesi yoluyla reaktif oksijen türlerini oluşturarak bir prooksidan görevi görebileceğini göstermiştir. Kurkuminin konjuge β -diketon yapısı, bakırın indirgenmesinde rol oynar. Bu sonuç, geçiş metallerinin konjuge β -diketon yapısı ile etkileşiminin, kurkuminin prooksidan aktiviteleriyle bağlantılı olabileceğini göstermiştir. Hücrelerdeki geçiş metallerinin indirgenmesi yoluyla moleküler oksijeni aktive ederek gelişen kurkuminin prooksidan aktivitesi, DNA hasarı ve apoptoz ile sonuçlanabilir.

Polifenoller radikal süpürme yoluyla antioksidan olarak hareket edebilirler, burada hidrojen atomu vererek serbest radikal zincir reaksiyonunu kırarlar. Ayrıca başka bir antioksidan mekanizmada, Fenton tipi reaksiyonlara katılmak için metal iyonunun kullanılabilirliğini sınırlayan metal şelasyonu yoluyla gerçekleşir. Bununla birlikte fenolikler, semikinon ve süperoksit (O_2^-) radikallerinin oluştuğu otooksidasyon yoluyla

prooksidan olarak da hareket edebilir. Bu radikaller çok reaktiftir ve proteinler veya DNA gibi temel makromoleküllere zarar verebilir (Mochizuki vd., 2002).

Geçiş metallerinin veya hidrojen peroksit varlığının fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesini azaltabileceği açıklanmıştır. Demir (III) veya bakır (II) varlığında fenoliklerin prooksidatif özelliklerinin artması, esas olarak metal iyonlarını azaltma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Daha sonra, demir (III) ve bakır (II), hidroksil radikali ve diğer reaktif oksijen türlerini üretmek için Fenton tipi reaksiyonlarla yeniden yükseltgenebilir. Fukumoto ve Mazza'nın (2000) yapmış olduğu çalışma, benzoik ve sinamik asit ürünleri (kafeik asit, sirinik asit, protokatekuik asit, *p*-kumarik asit ve vanilik asit) dahil olmak üzere birçok bileşiğin derişim, pH ve geçiş metal iyonlarının varlığına/yokluğuna bağılı olarak prooksidan olarak hareket edebildiğini göstermiştir (Fukumoto ve Mazza, 2000). Düşük redoks potansiyeline sahip kafeik asit ve protokatekuik asit de dahil olmak üzere orto-dihidroksile fenolik asitler, *p*-kumarik asit ve vanilik asit de dahil olmak üzere mono-hidroksil fenolik asitlerden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, kafeik asit ve protokatekuik asit, otooksidasyon ve semikinonlara/kinonlara dönüşüm yoluyla prooksidan aktivite sergileyebilir. Bu sonuçlar ayrıca kafeik asidin mono-hidroksil fenolik asit *p*-kumarik asitten daha düşük yükseltgenme potansiyel değerine ve daha yüksek serbest radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Sirinik asit gibi fenolik bileşiklerin metoksilasyonu yükseltgenme potansiyel değerini artırır ve antioksidan aktiviteyi azaltır. Genel olarak, antioksidatif ve prooksidatif özellikler arasında bir korelasyon vardır. 0,45 V'tan küçük yükseltgenme potansiyel değerine sahip tüm bileşikler lipid peroksidasyonu gibi oksidasyon süreçlerini önlerken, 0,45 V'tan büyük yükseltgenme potansiyel değerine sahip bileşikler prooksidan olarak hareket ederler (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Prooksidan potansiyeli olan polifenollerin kimyasal yapıları

Bhat ve diğerleri (2007)'nin yaptığı çalışmada insan periferik lenfositlerinde kafeik asidin neden olduğu prooksidan DNA hasarı incelenmiştir (Bhat vd., 2007). Bitkilerde bulunan ana polifenolik bileşikler grubu hidroksisinnamik asitlerdir. Hidroksisinnamik asit grubunun ana temsilcisi kafeik asittir. Kafeik asit, antitümorojenik (Tanaka vd., 1990), antienflamatuar (Michaluart vd., 1999) ve antimetastatik etkiler (Chung vd., 2004) gösterir ve HIV replikasyonunu inhibe eder (Kashiwada vd., 1995). Kafeik asit genellikle bir antioksidan olarak kabul edilir, ancak geçiş metallerinin varlığında prooksidan aktivite sergiler. Sonuçlar, kafeik asidin bakır gibi geçiş metali iyonlarının

varlığında oksidatif DNA parçalanma kabiliyetine sahip olduğunu ve kanser hücrelerinde apoptozun indüksiyonu yoluyla antikanser özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Kanser hücrelerinde daha yüksek hücre içi bakır seviyeleri nedeniyle, düşük bir kafeik asit derişiminin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermesi beklenebilir.

Flavonoidlerin Prooksidan Aktivitesi

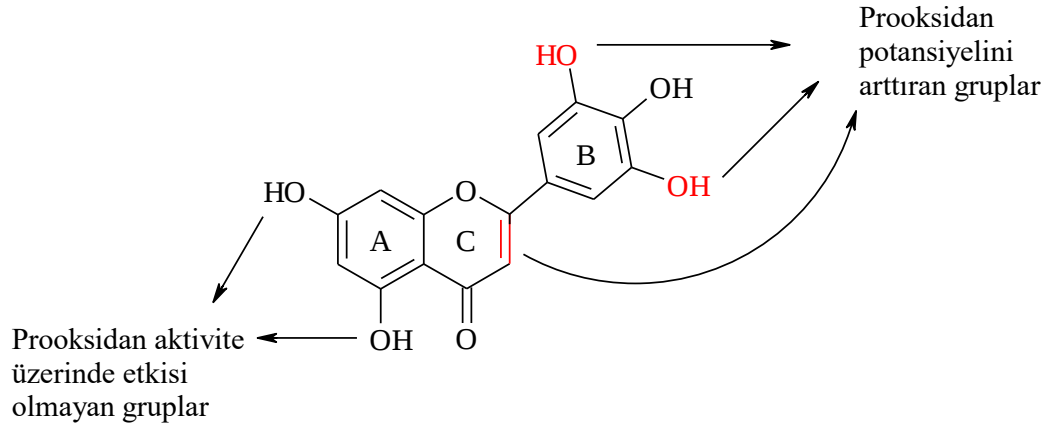
Flavonoidler, çok sayıda meyve ve sebze de doğal olarak ya serbest aglikonlar ya da glikozit olarak bulunur. Kimyasal olarak polifenoliktirler ve bir fenil benzopiron iskeletine (C6–C3–C6) sahiptirler. Flavonoidler, çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı ilgi konusu olmuştur. Flavonoidler açısından zengin diyetlerin kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağladığı kabul edilmektedir.

Flavonoidler, serbest radikal temizleme aktivitelerine ek olarak, antiviral, antikarsinojenik, antiinflatuar, antibakteriyel, antialerjik etkilerin yanı sıra siklooksijenaz, lipoksijenaz, glutatyon redüktaz ve ksantin oksidaz gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Flavonoidler bitkilerin her bölgesinde bulunur ve halka yapılarına bağılı bir dizi fenolik hidroksil grubu içeren geniş bir bileşik sınıfını kapsar (Guven vd., 2019).

Flavonoidlerin prooksidan aktivitesi, metal şelatlama özellikleri ve radikal temizleme kabiliyetleri ile ilgilidir. Flavonoidler ayrıca siklooksijenazlar ve lipoksijenazlar dahil olmak üzere prooksidan enzimleri de inhibe eder. Oksijen varlığında, demir ve bakır gibi geçiş metalleri flavonoidlerin redoks döngüsünü katalize ederek reaktif oksijen türlerine, lipidlere, DNA'ya ve diğer doğal moleküllere zarar verebilecek farklı organik radikallerin gelişmesine yol açar. Prooksidan toksisite, flavonoidlerin mitokondriyal solunumu engelleyen bir mekanizma olarak da kabul edilir. Bu, flavonoidlerin süperoksit anyonları vermek üzere geçiş metalleri tarafından katalize edilen otooksidasyona başlama yeteneği ile ilgilidir. Süperoksit anyonları, fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini oluşturur.

Yen ve diğerkleri (2003)'nin hesperetin, morin, kuersetin ve naringenin prooksidan aktivitesini insan lenfositlerinde incelemişlerdir (Yen vd., 2003). Flavanonlar naringenin ve hesperetin 0-200 µM derişim aralığında olduğunda hidrojen peroksit tespit edilememiş; ancak hidrojen peroksit derişimleri sırasıyla 25-200 µM kuersetin ve 125-200 µM morin derişimleri ile artmıştır. Bu çalışmada, kuersetinin insan lenfositlerini süperoksit kaynaklı oksidatif DNA hasarından koruyup korumadığı belirgin değildir. Bu sonuçlar, 100 µM'lık bir çözeltide kuersetinin prooksidan aktivite sergilediğini göstermiştir. Fisetin bileşiğı de bir prooksidan olarak hareket edebilir (Constantin vd., 2011). Fisetin karaciğer hücrelerinin oksidasyon durumunu artırır ve kuersetin için gösterilenlere benzer mekanizmalarla hareket ederek enerji metabolizmasını etkiler. Fisetinin prooksidan etkilerinin antioksidan etkilerinden daha baskın olduğu görölmektedir. Bu prooksidan aktivite, flavonoidlerin apoptotik ve antikanser aktivitelere ihtiyaç duyulduğunda faydalı olacaktır, çünkü reaktif oksijen türlerinin apoptotik DNA hasarına aracılık edebilir (Bhat ve Pezzuto, 2002). Kanser tedavisinde fisetin kullanımı 10-120 µM arasında plazma derişimleri gerektirir. Bu derişim, bileşiğın en güçlü tümör inhibitör etkilerinin rapor edildiğı aralıktır. Hepatik NADH/NAD⁺ oranını azaltabilen fisetin derişimleri ile antitümör etkileri olanlar arasında iyi bir örtüşme vardır.

Bir çalışma kuersetin ve türevlerinin prooksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Yang vd., 2012). Kuersetinin prooksidan aktivitesi diğerk fenoliklerle karşılaştırılmıştır. Test edilen bileşikler NADPH/peroksidaz/H₂O₂ ve DNA bölünme sistemlerinde farklı prooksidan aktiviteler göstermiştir. Hidroksil gruplarının sayısı, C halkasında bir çift bağın varlığı, hidroksil gruplarının konumu, sterik engel, peroksidaza afinite ve derişim flavonoidlerin prooksidan aktivitesi için önemli faktörlerdir (Şekil 2.11.). Prooksidan aktivitelerinin bir ölçüsü olarak NADPH'nin fenolikler ve flavonoidler tarafından oksidasyonu *p*-kumarik asit > rutin > kuersetin > ferulik asit şeklinde sıralanırken, DNA parçalama özellikleri kuersetin = rutin > *p*-kumarik asit > ferulik asit şeklinde sıralanmıştır.

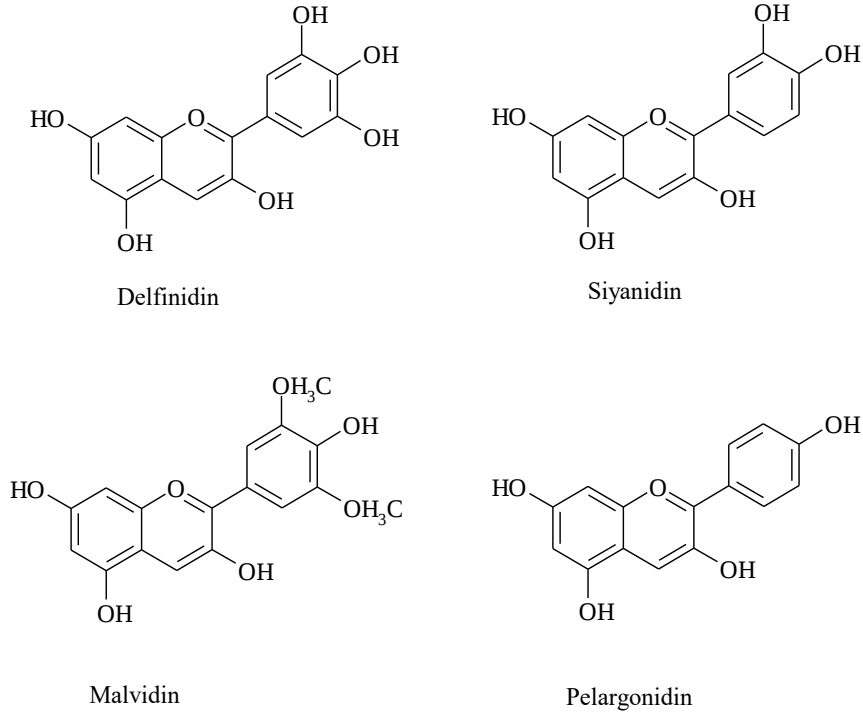


Şekil 2.11. Flavonoidlerde yapı-prooksidan aktivite ilişkisi

Antosiyaninlerin Prooksidan Aktivitesi

Antosiyaninler, bitkilerde doğal olarak bulunan kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumlu olan bir flavonoid sınıfıdır (Kong vd., 2003). Antosiyaninler, oksidatif stresi azaltan ve sonuçta kanser ve kardiyovasküler hastalıkları önleyen antienflamatuar ve antioksidan özellikler gibi kanıtlanmış özelliklere sahiptirler (Pool-Zobel vd., 1999). Bir flavonoid pigment sınıfı olarak antosiyaninler, geçiş metallerinin varlığında antioksidanlardan prooksidanlara geçerek reaktif oksijen türleri oluşumuna ve ardından DNA hasarına neden olabilir. Flavonoidler gibi, siyanidin ve delfinidin de dahil olmak üzere katekol B halkalı antosiyaninler (Şekil 2.12.) daha düşük indirgeme potansiyellerine ve daha fazla prooksidan aktiviteye sahiptir.

Bir çalışmada bazı antosiyaninlerin antioksidan ve prooksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir (Fukumoto ve Mazza, 2000). Bir linoleik asit emülsiyon sisteminde, malondialdehit oluşumu HPLC ile analiz edilmiş ve bir metal katalizör (Cu^{2+}) tarafından başlatılan antioksidan ve prooksidan özelliklerini belirlemek için kullanılmıştır.



Şekil 2.12. Prooksidan potansiyele sahip antosiyaninlerin kimyasal yapıları

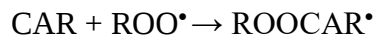
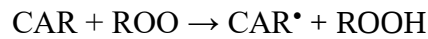
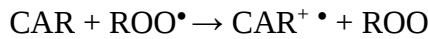
Bu çalışma, delfinidin, siyanidin, malvidin ve pelargonidin dahil olmak üzere antosiyaninlerin, Cu^{2+} katalizörü kullanıldığında insan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve lesitin-lipozom yapılarında prooksidan özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Hanif ve diğerleri (2008) de delfinidinin Cu^{2+} varlığında DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir. Bulguları, neokuproinin (hücrelerin içinde bulunan bakır şelatörü) prooksidan süreçleri ve DNA hasarını engelleyebildiğini, buna karşın bathokuproinin (hücrelerin dışında bulunan bakır şelatörü) hiçbir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, bakır varlığında delfinidinin sitoplazma ve çekirdekte oksidatif süreçleri ve DNA hasarını indüklediğini göstermektedir (Hanif vd., 2008). Bununla birlikte, fenoliklerin prooksidan aktivitesinin mutlaka fenoliklerin doğrudan bir reaksiyonu ile ilgili olmadığı unutulmamalıdır. Son zamanlarda, siyanidinin doğrudan prooksidan aktivitesinden ziyade katalazın (hidrojen peroksiti ayrıştıran antioksidan enzim) inhibisyonu yoluyla dolaylı olarak oksidatif stres ve apoptozu indüklediğini belirtilmiştir (Scheit ve Bauer, 2014). Bir çalışmada antosiyaninler bakımından zengin olan mürver ekstresinin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunda hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteler gösterdiğini ve bunların ekstre eklenme zamanına ve bakır varlığına bağlı olduğu belirlenmiştir (Abuja vd., 1998).

Karotenoidlerin Prooksidan Aktivitesi

Karotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen ve çok sayıda gıdada bulunan, yağda çözünen renkli pigmentlerdir. İyi bilinen karotenoidler arasında likopen, β -karoten, lutein, astaksantin, fukoksantin, kantaksantin, krosin ve zeaksantin bulunmaktadır. Çalışmaların çoğu, β -karoten bakımından zengin gıdaların tüketiminin artmasının akciğer ve diğer bazı kanser risklerinin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Likopenin antioksidan gücü E vitamininden 100 kat daha fazladır. Likopen kardiyovasküler hastalıkların ve başta prostat kanseri olmak üzere bazı kanser türlerinin önlenmesinde büyük bir role sahiptir (Agarwal vd., 2014). Ancak, β -karoten gibi karotenoidlerin yüksek dozlarda tüketimi çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. β -karoten, sigara içenlerde kardiyovasküler hastalıklar ve tümör insidansı gibi zararlı etkilere neden olmaktadır (Kiokias ve Gordon, 2004).

Likopen, β -karoten ve lutein gibi karotenoidlerin prooksidan özellikleri, yüksek dozları kullanıldığında *in vitro* olarak tanımlanmıştır. β -karotenin antioksidan performansı kısmen oksijen basıncına bağlıdır (Mortensen vd., 1997). Düşük oksijen basıncında β -karoten zincir kırıcı bir antioksidan gibi davranırken, daha yüksek oksijen basıncında karotenoid antioksidan aktivitesini kaybeder ve otooksidasyonu nedeniyle prooksidan davranış gösterir.

Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi, radikal süpürme yetenekleri ve lipid peroksil radikallerini söndürmeleri ile ilişkilidir. β -karoten, yüksek karotenoid ve oksijen derişimlerinde bir prooksidan olarak hareket edebilir. Peroksil radikalleri lipidlerin otooksidasyonu sırasında üretilir. Karotenoidler (CAR) aşağıdaki reaksiyonlara göre radikalleri temizler:



Burton ve Ingold (1984) çalışmalarında β -karotenin etkili bir zincir kırıcı antioksidan olarak peroksil-karotenoid radikali (ROOCAR*) ürettiğini öne sürmüştür. β -karotenin bir antioksidan olarak hareket ettiğini, ancak oksijen basıncı arttıkça, muhtemelen otooksidatif süreçler nedeniyle β -karotenin bir antioksidan olarak etkinliğinin azaldığını göstermişlerdir (Burton ve Ingold, 1984). Nötr karotenoid radikalleri oksijenle reaksiyona girerek karotenoid peroksil radikalleri üretir. Yüksek oksijen basıncında karotenoid, prooksidan olarak hareket edebilen ve lipid peroksidasyonuna neden olan bir karotenoid peroksil radikali üretmek için oksijenle reaksiyona girebilir (Zhang ve Omaye, 2001). Daha yüksek karotenoid derişimleri 150 ve 760 Torr oksijen basıncında lipid oksidasyonunu artırırken, 15 Torr oksijen basıncında lipid oksidasyonunu azaltmaktadır. Karotenoidlerin göreceli antioksidan aktivitesi, α -tokoferol gibi diğer antioksidanlarınkine benzer şekilde oksijen basıncına bağlıdır (Paloza ve Krinsky, 1992). Yüksek oksijen basıncında α -Tokoferol bir antioksidan olarak daha etkilidir, ancak düşük oksijen basıncında β -karoten daha düşük etkilidir. Bu sonuç, karotenoidlerin düşük oksijen kısmi basıncında ($p < 150$ Torr) antioksidan olarak davrandığını, ancak yüksek oksijen basıncında prooksidan olarak hareket edebildiklerini göstermektedir (Beutner vd., 2001). Buna ek olarak, karotenoidin derişimi, prooksidan aktivitesi baskın olduğu için aktivitesini etkileyebilir.

2.5. Antioksidanlar Arasındaki Etkileşim Türleri

Doğal veya sentetik gıda ürünlerinde kullanılan antioksidanlar kendi aralarında etkileşime girebilir ve sinerjistik, ilave (additive) ve antagonistik etkileşimlere neden olabilir.

Sinerjistik Antioksidan Etkileşimi ($A_1 + A_2 > A_T$): İki veya daha fazla farklı antioksidanın birlikte uygulandığında antioksidan etkisi, ayrı ayrı uygulanan tek tek antioksidan etkilerin toplamından daha büyüktür. Sinerjistik etkileşim, tüm tek tek antioksidanlar için aynı veya farklı dozlarda gözlemlenebilir.

İlave (additive) Antioksidan Etkileşimi ($A_1 + A_2 = A_T$): Birlikte uygulandığında iki veya daha fazla farklı antioksidanın antioksidan etkisi, ayrı ayrı uygulanan bireysel antioksidan etkilerin toplamına eşittir.

Antagonistik Antioksidan Etkileşimi ($A_1 + A_2 < A_T$): Birlikte uygulandığında iki veya daha fazla ayrı antioksidanın antioksidan etkisi, ayrı ayrı uygulanan bireysel antioksidan etkilerin toplamından daha azdır.

Bir gıdanın toplam antioksidan kapasitesi, belirli bir gıdada potansiyel olarak bulunan tüm antioksidanların antioksidan aktivitelerinin net sonucudur. Farklı bileşenler arasındaki etkileşimler sinerjistik, ilave (additive) ve antagonistik olabilir. Örneğin, farklı gıdaların fenolik özütleri çiftler halinde karıştırıldığında, dört kimyasal bazlı antioksidan modelde sinerjistik, ilave (additive) ve antagonistik etkiler gösterir. Ferulik asidin, α -tokoferol ve β -karoten ile antagonistik etkileşimler sergilediği, ancak askorbik asit ile sinerjistik olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Tsao, 2015).

2.6. Antioksidanların Sinerjistik Etkileşimleri

Üç farklı antioksidan etkileşim türü olmasına rağmen, sinerjistik etkileşim en çok ilgi çekendir çünkü birkaç avantajı vardır:

1. Gıdaların daha yüksek kalite ve daha uzun raf ömrüne yol açan artan etkinliği,
2. Gerekli antioksidan miktarının azalması, dolayısıyla daha düşük üretim maliyeti,
3. Sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olabilecek sentetik antioksidanların kullanımının azalması veya tamamen yenilenmesi,
4. Bazı gıdalarda antioksidanların daha eksiksiz bir şekilde dağılması sinerjistik kombinasyonlar ile sağlanabilir.

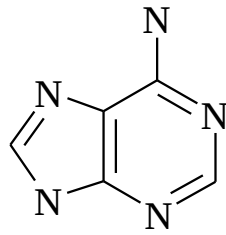
Sinerjistik etkinin genellikle aynı sistemde bulunan farklı antioksidanların indirgeme potansiyelindeki farklılık nedeniyle ortaya çıktığı kabul edilir. İndirgeme potansiyel değeri (E°), antioksidanların termodinamik özelliğidir. Teorik olarak, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) gibi lipidler için sıfırdan büyük herhangi bir indirgenme potansiyeli ($E^\circ > 0$) yapının potansiyel bir oksidan ve herhangi bir negatif net indirgenme potansiyeli ($\Delta E^\circ < 0$) yapının bir antioksidan olduğunu gösterir (Tsao, 2015).

Son yıllarda, vitamin-antioksidan bileşikleri arasında fitokimyasalların, özellikle polifenollerin ve karotenoidlerin rolleri keşfedilmiştir. Bu fitokimyasal antioksidanların

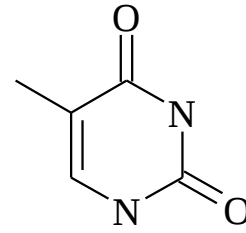
sağladığı sinerjistik etkiler, yalnızca biyolojik sistemlerde oksidatif streslere karşı entegre bir savunma mekanizması olarak etkilere sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda gıda kalitesine ve raf ömrüne de uygulanabilir (Tsao, 2015).

2.7. DNA'nın Yapısı

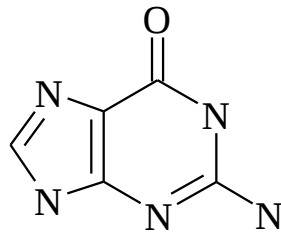
Deoksiribonükleik asit (DNA), monomerik birimlerden oluşur ve genetik bilginin depolanması, korunması, ifade edilmesi ve iletilmesinden sorumludur. DNA, aromatik bazlardan (bir pürin veya pirimidin halkası), riboz şekerleri ve fosfat gruplarından oluşur. Bazların ve şekerlerin yapılarındaki ve bazın şekerle yapısal ilişkisindeki birçok varyasyon, DNA'nın sarmal yapısında farklılıklara neden olur. Pürin yapısında adenin (A) ve guanin (G), pirimidin yapısında timin (T) ve sitozin (C) bazları arasındaki hidrojen bağları ile çift zincirli sarmal bir yapıya sahiptir (Sinden, 1994).



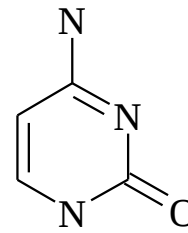
Adenin



Timin



Guanin



Sitozin

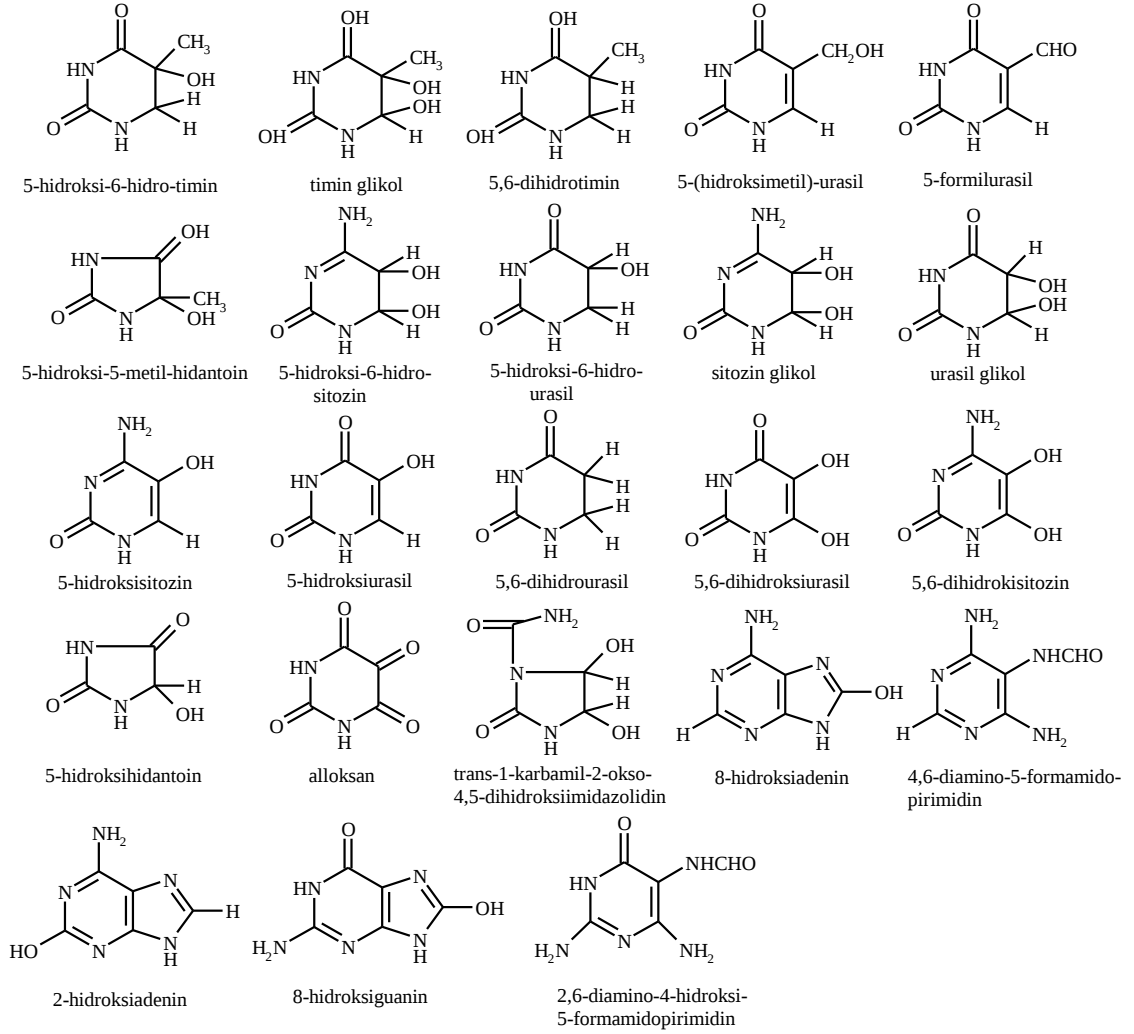
Şekil 2.13. DNA'da bulunan pürin ve pirimidin yapısındaki bazlar

2.8. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma arasındaki kritik dengenin elverişsiz olduğu durumlarda ortaya çıkan oksidatif hasarın durumunu tanımlamak için kullanılır. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunmalar arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres, lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlerin hasar görmesi ile ilişkilidir. Serbest radikaller, aerobik organizmanın bir yan ürünü olarak veya UV radyasyonu, zararlı kimyasallar, hava kirliliği, stres, duman, ilaç zehirlenmeleri, bakır, nikel, kadmiyum, demir, cıva, krom gibi metal iyonları gibi çeşitli dış etkilerle oluşabilir. Organizmadaki serbest radikallerin çoğu oksijenden oluşan moleküllerdir. Oksijen molekülünün kısmi indirgenmesinden kaynaklanan reaktif oksijen türleri, hidroksil ($\bullet\text{OH}$), süperoksit (O_2^-), hidroperoksil ($\text{HOO}\bullet$), peroksil ($\text{ROO}\bullet$) ve alkoksil ($\text{RO}\bullet$) radikalleridir. En reaktif serbest radikal hidroksil radikalidir. DNA molekülünün tüm bileşenleri ile reaksiyona girer. Reaktif oksijen türlerindeki artış oksidatif strese neden olur ve DNA, protein ve ribozom gibi hücrel bileşenlere zarar verir (Dreher ve Junod, 1996).

2.9. Oksidatif Stres Sonucu DNA Parçalanma Ürünleri

Reaktif oksijen türleri DNA yapısında 25'ten fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar (Şekil 2.13.). Hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksiguanin (8-OHG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir. Deoksiguanozinin C8 bağına $\bullet\text{OH}$ bağlanması ile oluşur.



Şekil 2.14. DNA bazlarının oksidatif hasar ürünleri

2.10. Oksidatif Stres Sonucu DNA Hasarının Onarımı

In vivo oksidatif DNA hasarı çeşitli enzimler tarafından sürekli olarak onarılır (Demple ve Harrison, 1994). DNA glikozilazlar, DNA bazlarını kesip çıkarır ve daha sonra abazik bölgenin her bir bölgesindeki fosfodiester bağları endonükleazlar tarafından kesilerek sağlam bir nükleotidin eklenmesine izin verir. Endonükleaz III gibi bazı enzimler oksitlenmiş pirimidinlerin onarımı için hem glikozilaz hem de endonükleaz aktivitelerine sahiptir. Timidin, timin glikol ve hidroksiürasil dahil olmak üzere bu eksizyonun onarım ürünleri idrarla atılır. *Escherichia coli*'deki formamidopirimidin-DNA glikosilaz enzimi oksitlenmiş pürinleri 8-oksoguanin ve 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidini ve daha az oranda karşılık gelen adenin türevlerini baz

eksizyonu yoluyla onarır (Boiteux vd., 1992). Formamidopirimidin DNA glikozilaz proteininin kodlama yapmayan ve aktif olarak transkribe edilen DNA dizilerindeki 8-hidroksiguanini eşit etkinlikte onardığı görülmektedir. Hasarlı bazın serbest bırakılmasından sonra, ekzonükleazlar yeni bir nükleotidin eklenmesi için apuridik bölgeyi keser. İnsanlarda, 8-hidroksiguanin'in tam nükleotidin tek adımlı eksizyonu ile onarımına ek olarak, 8-hidroksiguanin veren benzer iki adımlı yollar tanımlanmıştır (Bessho vd., 1993).

2.11. DNA Oksidatif Hasarı Tayin Yöntemleri

DNA lezyonlarının doğru ölçümü, oksidatif DNA hasarının mekanizmalarını, hücresel onarımını ve bu hasarın belirli hastalıklardaki rolünü anlamak için gereklidir. Oksidatif DNA hasarı, comet deneyi, immünokimyasal yöntemler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrokimyasal dedektör (HPLC-ECD), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) gibi çeşitli teknikler kullanılarak ölçülebilir.

2.11.1. Comet Deneyi

Tek hücre jel elektroforezi olarak bilinen comet deneyi oksidatif DNA hasarının ölçümüne uygulanabilen bir tekniktir. Hücrelerin mikroskop lamı üzerinde ince bir agaroz jele dökülmesini ve elektroforez kullanılarak DNA'nın çekirdeklerden çıkarılmasını içerir. Kromatin ne kadar parçalanmışsa, DNA o kadar fazla göç eder ve (boyandığında) çekirdekten anot yönünde uzanan bir dağınık bir çizgi oluşturur. Comet deneyi, dokudan bozulmadan izole edilmiş olmaları koşuluyla herhangi bir hücre popülasyonuna uygulanabilir (Lovell ve Omori, 2008). Bu deney, DNA hasarını tespit etmek için hassas bir yöntemdir. Kromatografik ve diğer testlere kıyasla comet testinin en büyük avantajı basitliği ve minimum örnek hazırlığıdır. Bununla birlikte, potansiyel sorunlar vardır. Testin kalibrasyonu dolaylıdır. Oksidatif hasar miktarının hesaplanması, enzim muamelesini takiben arka plan comet değerinin, comet değerinden çıkarılmasına bağlıdır.

2.11.2. İmmünokimyasal yöntemler

DNA'nın metillenmiş serum albümini gibi bir taşıyıcı moleküle bağlanması halinde immünojenik hale gelebileceği ilkesi, DNA için prob olarak antikorların geliştirilmesinde ilk adım olmuştur. Bir sonraki aşama, oligodeoksinükleotidlerin de DNA antikorlarının üretilmesi için hapten olarak işlev görebileceğini göstermiştir (Shigenaga vd., 1994). DNA'daki oksidatif hasarın immünokimyasal tekniklerle tespit edilmesi, özellikle basitlik, tekrarlanabilirlik ve çok yönlülük açısından bazı açık avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, antikorlar tipik olarak bir miktar çapraz reaktivite gösterdiğinden özgüllüğü belirsizdir. Örneğin, bu antikorlar 8-okso-deoksiganin'ni 8-okso-Guanin veya oksitlenmiş RNA'dan ayırt edemez. İmmünokimyasal yöntemlerin bir diğer dezavantajı da antikorların geliştirilmesinin zaman alıcı olmasıdır.

2.11.3. GC-MS

GC-MS'in DNA hasarının incelenmesinde kütle spektrometrik olmayan yaklaşımlara göre temel avantajı, tek bir analiz sırasında birden fazla oksidasyon ürününü ölçme yeteneğidir (Dizdaroglu, 1994). DNA örneklerinin GC-MS analizinde DNA'nın tek tek bazıları serbest bırakmak üzere hidrolize edilmesi ve ardından bazların GC-MS için uçuculuklarını ve termal kararlılıklarını artırmak üzere türevlendirilmesi gerekir. Bu yöntem, hidroliz, türevlendirme ve gaz kromatografik analiz sırasında yapay oksidasyon olasılığı nedeniyle eleştirilmiştir. DNA oksidasyon ürünlerinin GC-MS analizleri, tipik olarak diğer yöntemler kullanılarak elde edilen değerleri 10 kat aşan yüksek seviyeler verir (Cadet vd., 1997). Yapay DNA oksidasyonunun spesifik kaynakları aşağıdakileri içerebilir;

1. Hidroliz ve türevlendirme sırasında kullanılan yüksek sıcaklıklar; 8-okso-hidroksiganin'in glikozidik bağını hidrolize etmek için gereken enerjinin deoksiganin için olandan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Gackowski vd., 2001).
2. Oksitlenmiş nükleozitlerin hidroliz verimliliği hasar görmemiş nükleotitlerinkinden daha düşük olabilir.
3. GC enjektörünün ve kolonun yüksek sıcaklığı (~300°C) bazların oksidasyonunu veya ayrışmasını teşvik edebilir.

DNA oksidasyonunun bazen oksitlenmiş ve doğal deoksinükleozidlerin molar oranının yanı sıra başka birimler kullanılarak da rapor edildiği unutulmamalıdır. Örneğin, GC-MS kullanan laboratuvarlar DNA hasarını genellikle mg veya ng, DNA başına nmol, pmol veya finol oksidasyon ürünü olarak rapor eder. Bununla birlikte, DNA hasarını raporlamak için en yaygın kullanılan birimler 10^5 veya 10^6 doğal baz veya deoksinükleozit başına oksitlenmiş baz veya nükleozit sayısıdır.

2.11.4. HPLC-ECD

DNA oksidatif ürünlerini tespit etmek için alternatif bir yaklaşım yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektron yakalama dedektörü (HPLC-ECD)'dir. HPLC-ECD ile 8-okso-hidroksiguanin analizi için göreceli basitliği ve yüksek hassasiyeti, HPLC-ECD'yi *in vivo* olarak elde edilen örneklerde DNA oksidasyonunu izlemek için popüler bir yöntem haline getirmiştir (Mecocci vd., 2002; Wei vd., 2002; Yeh ve Hu, 2000). Ancak bu yöntem yalnızca 8-okso-hidroksiguanin gibi elektrokimyasal olarak aktif bileşikleri ölçmek için kullanılabilir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihazlar ve kullanım amaçları

Cihazlar	Model/Marka	Kullanım Amacı
Çoklu manyetik karıştırıcı	MS-MP8, Wisc	Analizlerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Etüv	DRY-Line, VWR	DNA’da oluşan oksidatif baz hasar ürünlerinin tayininde türevlendirme amacıyla kullanılmıştır.
GC-MS/MS	Trace 1300, Thermo Scientific	DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin kantitatif analizinde kullanılmıştır.
Hassas analitik terazi	MS105DU, Mettler Toledo	Deneylerde kullanılacak kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	Are, Velp	Deneylerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Liyofilizatör	FreeZone 2,5 Plus, Labconco	DNA’da oluşan oksidatif baz hasar ürünlerinin belirlenmesi için örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır.
pH metre	HI 221, Hanna	Deneylerde kullanılacak tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Saf su cihazı	Option Q DV25, Elga Purelab	Analizlerde kullanılan saf suyun temininde kullanılmıştır.
Santrifüj	Z 206 A, Hermle	Örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	2,8 L, United	Örneklerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
UV-GB Spektrofotometresi	Cary 50 Conc, Varian	Spektroskopik analizlerde kullanılmıştır.
Vorteks karıştırıcı	VM-10, Wisc	Analizlerde kullanılacak kimyasalların karıştırılmasında kullanılmıştır.

3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
2-hidroksiadenin	TRC	I819000
2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin	Sigma-Aldrich	93285
2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin	Pubchem	127546
2,8-dihidroksiadenin	TRC	D45105
4,6-diamino-5-formilaminopirimidin	Santa Cruz	217034
4,6-diamino-5-nitropirimidin	Sigma-Aldrich	S454605
5-formil urasil	IS Chemical Tech	1195080
5-hidroksi-5-metilhidantonin	TRC	H947500
5-hidroksihidantonin	TRC	H943000
5-hidroksimetil sitozin	TRC	H945870
5-hidroksimetil urasil	Sigma-Aldrich	852589
5-hidroksisitozin	Pubchem	3014752
5-hidroksiurasil	Pubchem	73268
5,6-dihidrotimin	TRC	D449440
5,6-dihidrourasil	Sigma-Aldrich	D7628
8-hidroksi-2-deoksiguanozin	Sigma-Aldrich	H5653
8-hidroksiadenin	Pubchem	5355054
Alloksan	Titan Biotech	2244113
Asetik asit	Merck	100063
Asetonitril	Sigma-Aldrich	34851
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Buzağı timüs DNA’sı	Sigma-Aldrich	D4522
Demir (II) sülfat heptahidrat	Merck	103965
Demir (III) klorür	Merck	803945
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar (devamı)

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
Formik asit	Merck	100264
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich	16911
Hidroklorik asit	Merck	100314
Kafeik asit	Sigma-Aldrich	C8221
Metanol	Merck	106007
N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid	Sigma-Aldrich	15222
Oleik asit	Teknik	-
Piridin	Sigma-Aldrich	270970
Rosmarinik asit	Sigma-Aldrich	536954
Sodyum asetat trihidrat	Sigma-Aldrich	S8625
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat	Sigma-Aldrich	217255
Timin glikol	Pubchem	2943568
Troloks	Sigma-Aldrich	238813

3.1.3. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası	Özellikleri
Mikropipet	Eppendorf	Z683809	10 – 100 µL
Mikropipet	Eppendorf	Z683825	100 – 1000 µL
Mikropipet	Eppendorf	Z683833	500 – 5000 µL

3.1.4. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- 1,0 g NaOH ve 5,0 g Na₂CO₃ tartılıp balon jojede saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak Lowry A çözeltisi hazırlanmıştır.
- 0,5 g NaKC₄H₄O₆ ve 0,25 g CuSO₄ tartılarak balon jojede saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak Lowry B çözeltisi hazırlanmıştır.
- 50:1 oranında Lowry A ve Lowry B çözeltileri karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanmıştır.
- Folin-Ciocalteu reaktifi 1:3 oranında saf su ile seyreltilerek Folin-Ciocalteu çözeltisi hazırlanmıştır.
- 0,1 g gallik asit tartılıp balon jojede 100 mL'ye metanol ile tamamlanarak gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Antioksidan kapasite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

FRAP yöntemi:

- pH 3,6 asetat tamponu için; 925 mL 0,1 M CH₃COOH ve 75 mL 0,1 M CH₃COONa çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. 0,1 M Sodyum asetat çözeltisi için; 13,6 g CH₃COONa.3H₂O tartılarak balon jojede saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. 0,1 M Asetik asit çözeltisi için; 0,6 mL derişik CH₃COOH (%99,5-1,05 g/cm³) saf su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 40 mM hidroklorik asit çözeltisi için; 332 µL derişik HCl (12,06 M) saf su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 10 mM TPTZ çözeltisi için; 0,3 g 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) 40 mM HCl içinde çözülerek balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 20 mM demir (III) klorür çözeltisi için; 0,3 g FeCl₃ saf su ile çözülerek toplam hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

- pH 3,6 tamponu, TPTZ ve FeCl_3 çözeltileri sırasıyla 10:1:1 oranlarında karıştırılarak FRAP çözeltisi hazırlanmıştır.
- 1 mM Troloks çözeltisi için; 25 mg troloks metanol ile çözülüp balon jode 100 mL'ye tamamlanmıştır.

DNA oksidasyonu çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Buzağı timüs DNA çözeltisi (0,5 mg/mL) için; 5 mg buzağı timüs DNA'sı 10 mL ultra saf su ile çözülerek hazırlanmıştır.
- 10 mM H_2O_2 çözeltisi için ilk olarak 9,79 M H_2O_2 çözeltisinden 205 μL alınıp saf su ile 10 mL'lik balon jode tamamlanarak 200 mM ara stok çözelti hazırlanmıştır. 200 mM H_2O_2 çözeltisinden 2,5 mL alınıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak 10 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlanmıştır.
- 10 mM Fe^{2+} çözeltisi için; 0,278 g $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak saf suda çözülüp hacmi balon jode 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

Tez kapsamında yapılan çalışmalar 3 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik çalışmalar
- Kemometrik çalışmalar
- Kromatografik çalışmalar

3.2.1. Spektroskopik yöntemler

Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde tayini

Elektron transferini temel alan Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yapılmıştır (Karkar vd., 2018). Deney tüplerine alınan x mL örnek/standart, 2-x mL saf su, 2,5 mL Lowry C çözeltisi ve 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi toplam hacim 4,75 mL olacak şekilde karıştırılmıştır. 30 dk boyunca karanlıkta bekletilen örneklerin absorbansları UV-GB Spektrofotometresi ile 750 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon

grafiği için artan derişimlerde hazırlanan standart gallik asit çözeltilerinden yararlanılmıştır. En küçük kareler (EKK) yöntemiyle hesaplanan doğru denkleminde gallik asit derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir (Çizelge 3.4). Elde edilen doğru denklemi kullanılarak örnek/standartların toplam fenolik madde içeriği mg GAE (gallik asit eşdeğeri) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Folin-Ciocalteu yöntemi kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı
Folin-Ciocalteu	1-30	$y=0,0571x-0,0178$	0,9957

FRAP antioksidan kapasite tayini

Antioksidan kapasite tayininde FRAP yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği için standart madde olarak artan derişimlerde hazırlanan troloks çözeltisi kullanılmıştır (Karkar ve Şahin, 2022). Deney tüplerine x mL örnek/standart ve 3-x mL FRAP reaktifi toplam hacim 3 mL olacak şekilde eklenmiştir. Örnek/standartlar 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. UV-GB spektrofotometresi ile 593 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Troloks derişimine karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek EKK yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). Örneklerin antioksidan kapasite değerleri için elde edilen doğru denklemi kullanılmıştır. Sonuçlar mg TE (troloks eşdeğeri) olarak hesaplanmıştır.

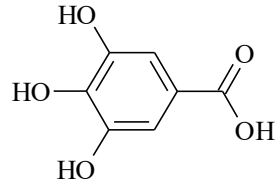
Çizelge 3.5. FRAP yöntemi kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı
FRAP	0,1-5	$y=0,2517x+0,0403$	0,9969

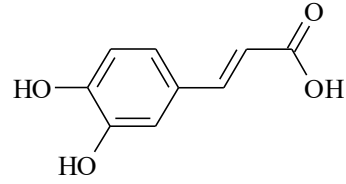
3.2.2. Kemometrik çalışmalar

Kemometrik yöntemler için gallik asit, rosmarinik asit ve kafeik asit çözeltileri kullanılmıştır. 100 µM gallik asit (GA), kafeik asit (KA) ve rosmarinik asit (RA)

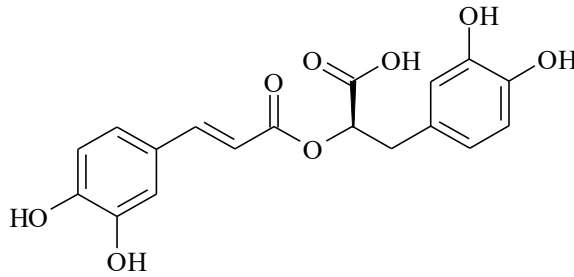
çözeltileri ayrı ayrı metanol ile hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler daha sonra analiz edilene kadar +4°C’de saklandı.



Gallik asit



Kafeik asit



Rosmarinik asit

Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan fenolik maddeler

GA, RA ve KA çözeltilerinin sinerjistik etki gösterdikleri optimum derişim değerin belirlenmesi için kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Bhat ve diğerlerinin (2007), yaptıkları çalışmaya göre derişim aralığı belirlenmiştir (Bhat vd., 2007). Bu derişim aralığı belirlenirken antioksidan maddelerin toksik derişim değlerinin altında çalışılmıştır. Buna göre kullanılan kodlanmış seviye ve gerçek seviye değleri Çizelge 3.6-3.7’da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değleri (kafeik asit (KA), rosmarinik asit (RA) ve gallik asit (GA))

Faktör	Kodlanmış seviyeler				
	-1,732	-1	0	1	1,732
KA (µM)	2,54	4	6	8	9,46
RA (µM)	2,54	4	6	8	9,46
GA (µM)	2,54	4	6	8	9,46

Çizelge 3.7. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu

Deney	Faktörler		
	x_1	x_2	x_3
	KA (μM)	RA (μM)	GA (μM)
1	4,00	4,00	4,00
2	8,00	4,00	4,00
3	4,00	8,00	4,00
4	8,00	8,00	4,00
5	4,00	4,00	8,00
6	8,00	4,00	8,00
7	4,00	8,00	8,00
8	8,00	8,00	8,00
9	2,54	4,00	4,00
10	9,46	4,00	4,00
11	6,00	2,54	4,00
12	6,00	9,46	4,00
13	6,00	6,00	2,54
14	6,00	6,00	9,46
15	6,00	6,00	6,00
16	6,00	6,00	6,00
17	6,00	6,00	6,00
18	6,00	6,00	6,00
19	6,00	6,00	6,00
20	6,00	6,00	6,00

3.2.3. DNA oksidatif hasar ürünlerinin belirlenmesi

Gaz kromatografisi kütle spektrometri/kütle spektrometri (GC-MS/MS) cihazı ile DNA’da oluşan oksidatif hasar ürünlerinin analizi yapılmıştır. GC-MS/MS ile DNA’da oluşan oksidatif baz hasar ürünlerinin ve örneklerin analizi için DB-5MS (Agilent 128-5512) kapiler kolonu (12 m, 0,20 mm, 0,33 μm) kullanılarak, seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) tekniği ile analiz gerçekleştirilmiştir. Her bir madde için alıkonma zamanı, 70 eV ile yapılan 1. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler, 2. iyonlaşma için uygulanacak en uygun enerji ve 2. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler belirlenmiştir. GC-MS/MS cihazı için çalışma koşulları ve sıcaklık programı Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9.’da verilmiştir (Aybastier, 2016).

Çizelge 3.8. GC-MS/MS cihazı çalışma koşulları

Enjeksiyon hacmi	2 µL
Enjeksiyon modu	Split
Split oranı	5
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Ara yüzey sıcaklığı	280°C
İyon kaynağı sıcaklığı	250°C
Hareketli faz akış hızı	1 mL/dk
Tarama modu	SRM (SIM/SIM)
GC program süresi	17 dk

Çizelge 3.9. GC-MS/MS cihazı için sıcaklık programı

Oran (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dk)
-	130	2
8	230	0
20	280	0

Daha sonra aşağıda belirtildiği gibi (ultra saf su kullanılarak) hazırlanan örnek karışımları analiz edilmiştir.

Çizelge 3.10. DNA oksidasyonu için çözeltiler

Yöntem	DNA	Fenton+H ₂ O ₂	Antioksidan (100 µM stok çözeltiliden)	Su
FOLİN	200 µL	37,5 µL+37,5 µL	196,75 µL KA 168,75 µL RA 235,5 µL GA	1586,5 µL
FRAP			200,75 µL KA 84,38 µL RA 150 µL GA	1752,3 µL

Analiz için hazırlanan örnekler -24°C’de dondurulmuştur. Dondurulmuş olan örnekler -86°C’de 100 mbar basınçta liyofilize edilmiştir. Asidik hidroliz için, liyofilize edilen örnekler 1 mL %60’lık formik asit ile 130°C’de 30 dk bekletilmiştir. Asidik hidroliz olan örnekler -24°C’de dondurulup, daha sonra tekrar -86°C’de 100 mbar basınçta liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler 41,6 µL piridin ve 58,4 µL %1 TMCS içeren BSTFA ile 120°C’de 40 dk bekletilip türevlendirilmiştir. Türevlendirilen örnekler direkt olarak GC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kemometrik yöntemler

Antioksidanlar tarafından gösterilen sinerjistik etki derişimlerini optimize etmek için 5 seviyeli 3 parametrelili, 20 deneyden oluşan çok yanıtli merkezi kompozit dizayn tasarlanmiştir. Çizelge 3.6 ve 3.7’da verilen seviyelere ve dizayn tablosuna göre 20 deney için toplam fenolik içerik (Folin-Ciocalteu) ve antioksidan kapasite (FRAP) ölçüm sonuçları kullanılarak yapılan ANOVA analizi için Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılmıştır. Merkezi kompozit dizayn yöntemi ile bulunan tahmini derişim değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kemometrik deneysel ve tahmini değerler

Deney	Toplam fenolik içerik (mg GAE)		Antioksidan kapasite (mg TE)	
	FOLİN		FRAP	
	Deneysel	Tahmini	Deneysel	Tahmini
1	22,37	25,28	28,39	30,54
2	25,29	26,36	36,40	36,93
3	20,47	21,46	31,78	31,51
4	32,61	35,74	37,29	36,07
5	23,95	23,85	32,62	33,82
6	29,40	31,44	38,40	38,66
7	29,17	31,13	41,70	41,16
8	51,79	51,91	44,36	44,19
9	20,12	18,28	34,12	32,65
10	39,41	37,21	39,30	40,80
11	23,99	22,05	40,20	37,80
12	38,58	36,48	41,00	43,42
13	32,49	29,29	28,26	27,57
14	42,90	42,06	36,72	37,43
15	27,99	29,69	27,40	27,22
16	29,17	29,69	25,84	27,22
17	28,53	29,69	26,62	27,22
18	34,00	29,69	26,54	27,22
19	29,80	29,69	27,56	27,22
20	28,66	29,69	29,37	27,22

Elde edilen 20 deney için ANOVA analizi sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. ANOVA sonucuna göre $p < 0,05$ olan parametreler önemli, $p > 0,05$ olan parametreler önemsiz olarak kabul edilmiştir. ANOVA analizi sonuçlarına göre oluşturulan denklemler Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kemometrik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları

Kaynak	FOLİN ($R^2 = 0,9322$)				
	DF	SS	MS	F değeri	p değeri
Model	9	1098,21	122,02	15,28	<0,0001
Lack of fit	5	55,72	11,14	2,31	0,1900
Pure error	5	24,14	4,83		

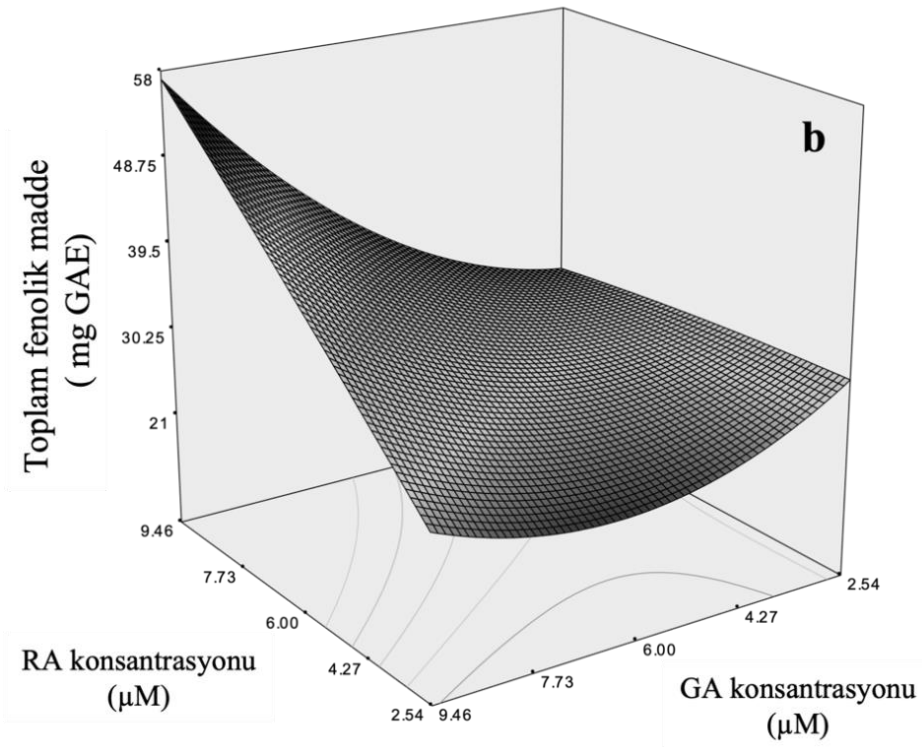
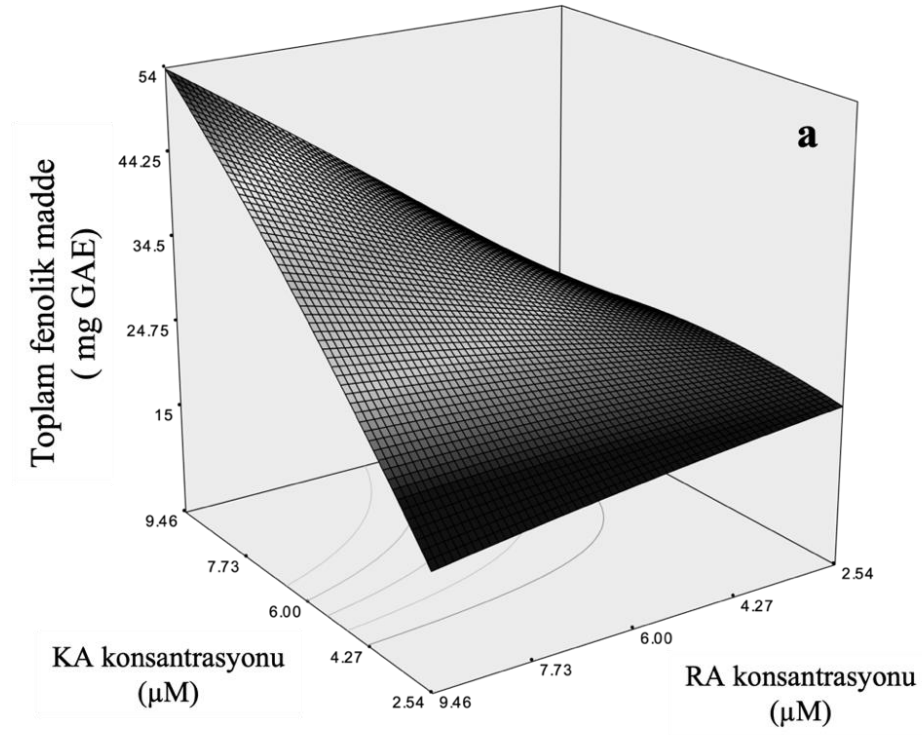
Kaynak	FRAP ($R^2 = 0,9483$)				
	DF	SS	MS	F değeri	p değeri
Model	9	687,11	76,35	20,38	<0,0001
Lack of fit	5	29,96	5,99	4,00	0,0773
Pure error	5	7,50	1,50		

DF: serbestlik derecesi, SS: karelerin toplamı, MS: ortalamaların karesi

Çizelge 4.3. Önemli parametrelere göre oluşturulan model denklemleri

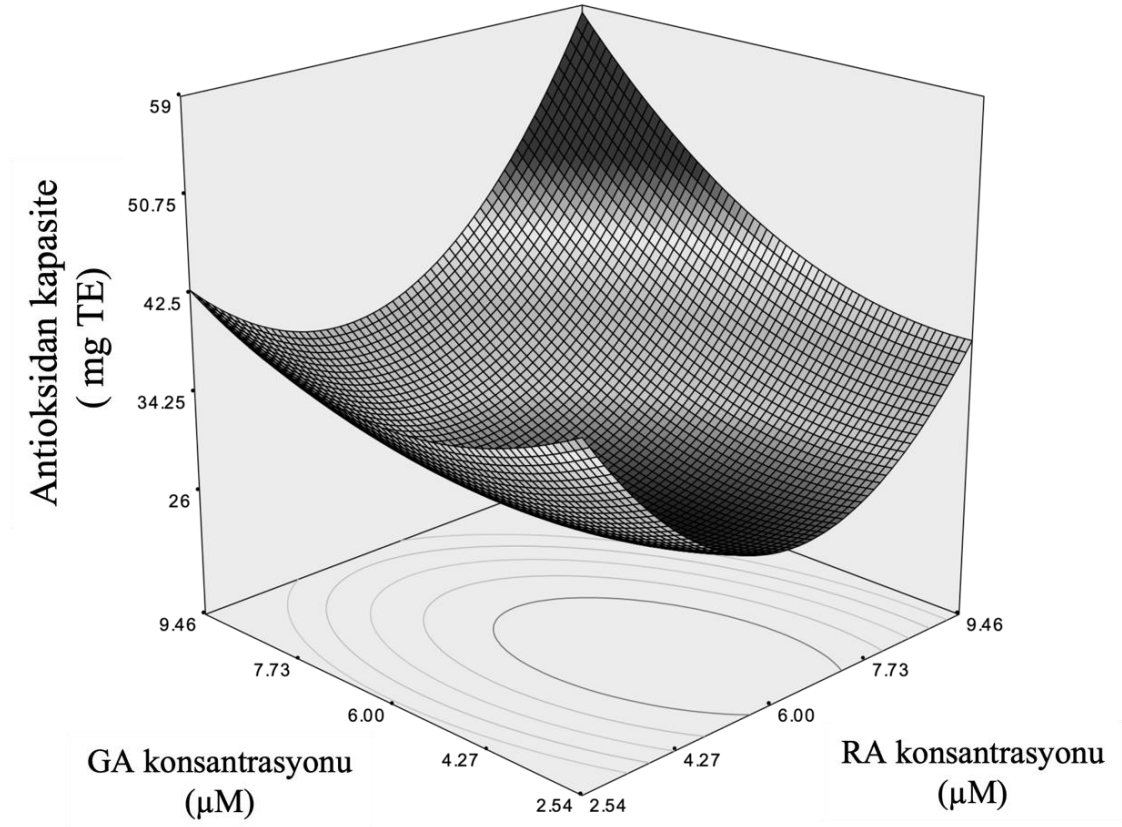
Yanıt	İkinci dereceden polinom denklemleri
FOLİN (mg GAE)	$y = 29,69 + 5,47x_1 + 4,16x_2 + 3,69x_3 + 3,30x_1x_2 + 2,77x_2x_3 + 2,00x_3^2$
FRAP (mg TE)	$y = 27,22 + 2,35x_1 + 1,62x_2 + 2,85x_3 + 1,59x_2x_3 + 3,17x_1^2 + 4,46x_2^2 + 1,76x_3^2$

Derişim değerleri ile toplam fenolik madde arasındaki ilişki Şekil 4.1.a ve Şekil 4.1.b’deki yanıt yüzey grafiklerinde gösterilmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenen toplam fenolik madde değerleri KA derişimi azaldıkça azalmaktadır. Bununla birlikte RA derişimi azalırken toplam fenolik madde değerleri de artmıştır. En yüksek toplam fenolik madde, en yüksek RA ve KA derişimde gözlenmiştir. Bununla birlikte Şekil 4.1.b’de en yüksek toplam fenolik madde, en yüksek GA ve RA derişiminde gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafikleri

Değişim değerleri ile antioksidan kapasitesi arasındaki ilişki, Şekil 4.2.'deki yanıt yüzey grafiği ile gösterilmiştir. FRAP yöntemi kullanılarak belirlenen antioksidan kapasite değeri en yüksek GA ve RA değerinde gözlenmiştir. Artan RA derişimi ile ilk başta antioksidan kapasitede azalma gözlenmiş, ancak RA derişimi 6 μM 'ye ulaştığında antioksidan kapasite artmaya başlamıştır.



Şekil 4.2. Antioksidan kapasite için yanıt yüzey grafiği

Sonuç olarak merkezi kompozit dizayn ile birleştirilmiş yüzey analiz yöntemi sinerjistik etki gösteren derişim değerlerini optimize etmek için başarıyla kullanılmıştır. GA, RA ve KA derişim değerleri arasındaki değişimlerin sinerjistik etki üzerinde olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre optimum koşullar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Merkezi kompozit dizayn için optimum koşullar

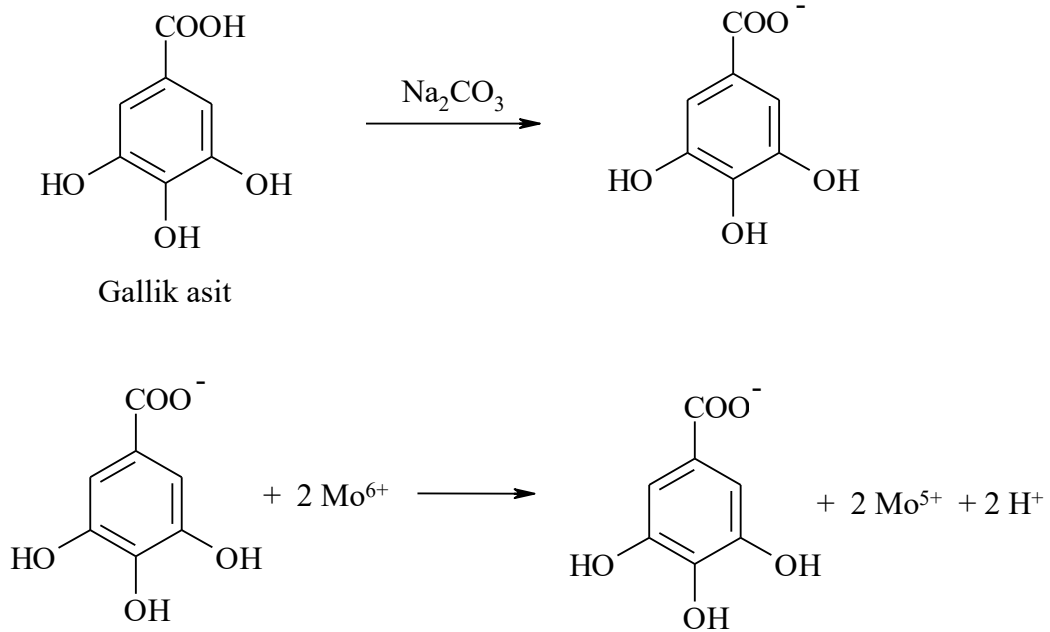
Yanıtlar	Optimum değerler		Antioksidanların optimum derişim değerleri		
	Tahmini	Deneyssel	KA (μM)	RA (μM)	GA (μM)
FOLİN (mg GAE) (maksimum)	53,48	51,46 $\pm$ 4,92	7,87	6,75	9,42
FRAP (mg TE) (maksimum)	47,27	45,99 $\pm$ 1,41	8,03	9,34	6,00

Çizelge 4.5. Antioksidanların sinerjistik/antagonistik etkisi

Fenolik madde	FOLİN (mg GAE)	FRAP (mg TE)
KA (μM)	13,33	6,09
RA (μM)	11,98	6,59
GA (μM)	18,81	22,06
Toplam (üçlü toplam)	44,12	34,74
Optimum (Deneyssel)	51,46	45,99
Etki	Sinerjistik	Sinerjistik

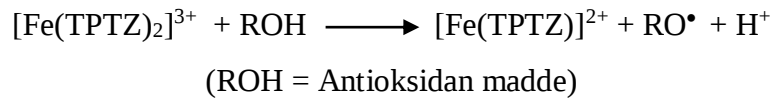
Folin Ciocalteu ve FRAP yöntemleri elektron transferine dayanan yöntemlerdir. Bu yöntemler reaksiyon karışımında bulunan iki bileşenin (antioksidan ve oksidan) reaksiyona dayanır. Folin Ciocalteu yönteminde antioksidan maddeler (fenolik bileşikler) ve diğer indirgen maddeler tarafından molibdenyuma elektron verilerek reaksiyon gerçekleşir. Oluşan mavi renkli kompleksin absorbands değeri 750 nm’de ölçülür. Bu yöntemde standart olarak kullanılan gallik asit, fenolik olmayan bir çok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından indirgenebilir. Bu nedenle Folin Ciocalteu yönteminde girişim etkisi oluşturabilen pek çok madde bulunabilir (Magalhães vd., 2008). (Folin Ciocalteu yöntemi, doğal ekstraktların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir. Antioksidan özellik belirleme çalışmalarında yaygın olarak

kullanılmaktadır. Ancak reaksiyon uzun sürmesi ve lipofilik bileşiklerin reaksiyon vermemesi dezavantajdır (Huang vd., 2005; MacDonald-Wicks vd., 2006; Magalhães vd., 2008). Folin-Ciocalteu yöntemi için reaksiyon şöyledir:



Şekil 4.3. Folin-Ciocalteu yöntemi reaksiyonu

FRAP yönteminde asidik ortamda Fe(III), Fe(II) formuna indirgenerek renkli ferrik-tripiridiltriiazin ($\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$) kompleksinin oluşmasına neden olur. Reaksiyon sonunda oluşan renkli kompleksin 30 dk sonra absorbans değeri 595 nm’de ölçülür. FRAP yöntemi diğer yöntemlere göre basit, hızlı ve ucuzdur (Magalhães vd., 2008; Prior vd., 2005). Asidik ortamda, antioksidanların varlığında gerçekleşen reaksiyon şöyledir:



Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) değeri; antioksidan kapasitesi araştırılan maddenin 1,0 mM çözeltisine eşdeğer antioksidan kapasitesine sahip bir Troloks çözeltisinin milimolar konsantrasyonu olarak tanımlanır. Fenolik bileşiklerde hidroksil gruplarının sayısı ve konumu, tüm molekülün konjugasyon derecesi bileşiğin antioksidan özelliğinde etkilidir. Tez kapsamında çalıştığımız maddeler kafeik asit (2

OH, -CH=CH-COOH), gallik asit (3 OH), rosmarinik asit (4 OH, -CH₂-COOH) ile TEAC değerleri sırasıyla 1,23; 2,63; 2,65 olarak bulunmuştur (Berker vd., 2010). Buna göre gallik asit ve rosmarinik asitin antioksidan kapasite değerleri derişim olarak birbirine yakındır. Çizelge 4.5.'te fenolik bileşiklerin (6 µM) FOLİN ve FRAP sonuçlarına bakıldığında tek olarak yüksek değerin gallik asit için elde edildiği belirlenmiştir. Bu da aynı derişimdeki fenolik maddeler için TEAC değerleri ile uyumlu bulunmuştur. Şekil 4.1.a.'da toplam fenolik madde için yüzey grafiklerine bakıldığında da rosmarinik asit derişimi en büyük, kafeik asit derişimi ise en küçük değerde iken toplam fenolik madde değeri maksimuma ulaşmıştır. Benzer durum Şekil 4.1.b.'de gallik asit derişimi en büyük, rosmarinik asit derişimi küçük iken maksimum toplam fenolik madde değeri görölmektedir. Aslında burada rosmarinik asit derişimindeki artışında yüksek olması beklenir, ancak gallik asit ve rosmarinik asitin birlikte bulunduğu ortamda bileşiklerin derişiminin artması ile ortaya çıkan sterik etkiden dolayı toplam fenolik madde değerleri azalabilmektedir. Şekil 4.2'ye incelendiğinde ise rosmarinik asit ve gallik asit derişiminin en yüksek olduğu değerde antioksidan kapasite değeri de maksimumdur. Optimizasyon sonuçlarına göre (Çizelge 4.4.) maksimum fenolik madde/antioksidan kapasite için fenolik madde derişimleri aynı değildir. Çünkü hem Folin Ciocalteu hem de FRAP yöntemi için reaksiyon koşulları ve fenolik maddelerin bu reaksiyona cevap verme kabiliyeti farklıdır. Bu da fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı ve sterik etki ile açıklanmaktadır. Kullanılan yöntemlerin ölçüm prensipleri ve deneysel koşulları reaksiyon verebildikleri fenolik madde gruplarına göre farklılık göstermektedirler. Bu nedenle farklı yöntemler için farklı optimum derişim değerleri bulunabilir. Ayrıca Çizelge 4.5.'e göre bulunan optimum derişim değerleri için deneysel belirlenen sonuçlar tek tek toplam sonuçlarından daha yüksektir. Buna göre belirlenen optimum derişim değerlerinde bulunan sonuçlar antioksidan maddelerin sinerjistik etkileşim içinde olduğu göstermektedir.

4.2. GC-MS/MS analizi

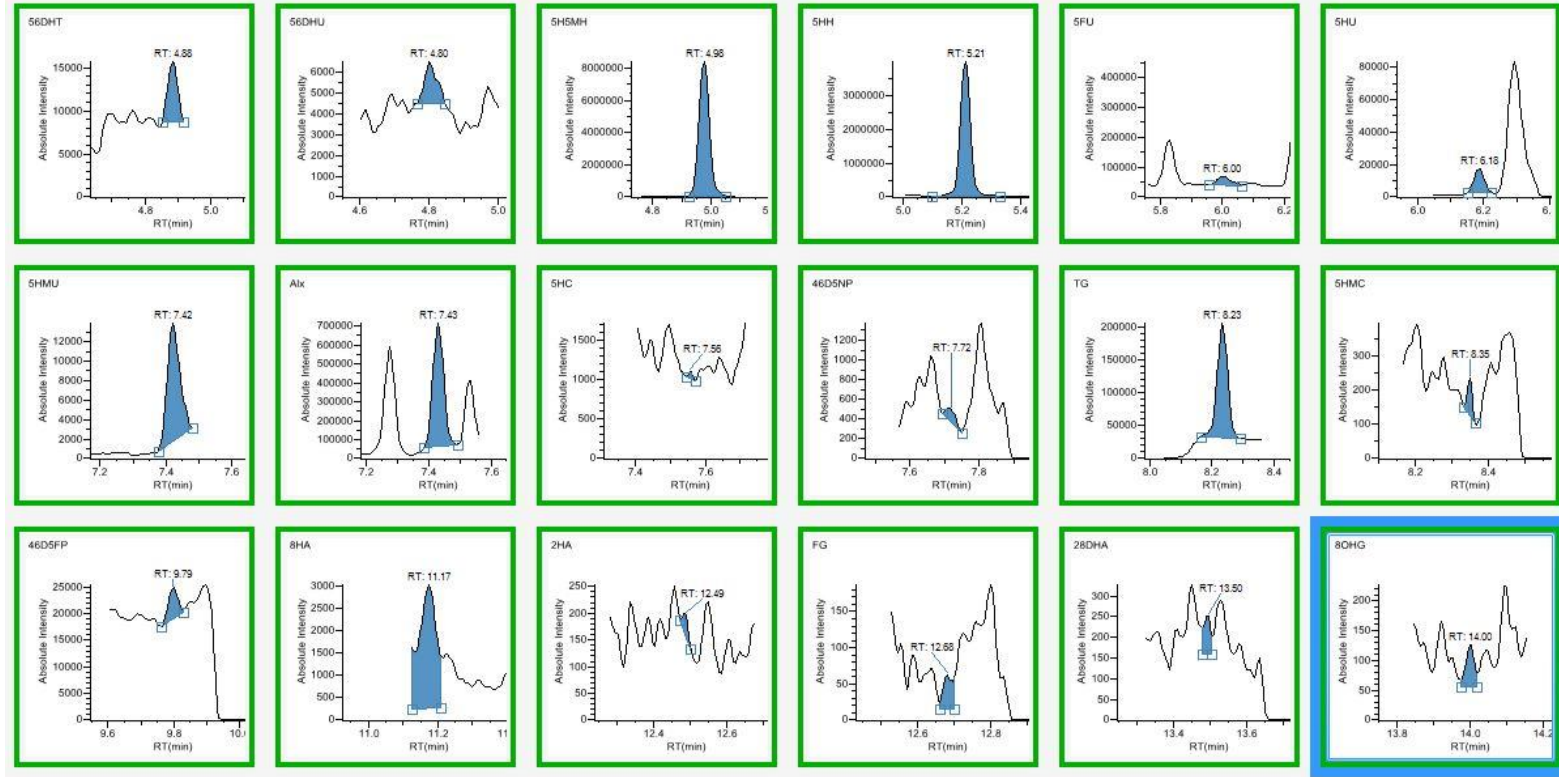
Bu çalışmada antioksidanların gösterdiği sinerjistik etkinin DNA oksidatif hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bölüm 3.2.3'te belirtilen şekilde hazırlanan DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin kromatografik olarak Çizelge 3.8. ve Çizelge 3.9.'da belirtilen GC-MS/MS çalışma koşullarında analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir hasar

ürününün belli derişim aralıklarında belirlenen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları Çizelge 4.6’da verilmiştir (Dawbaa vd., 2017).

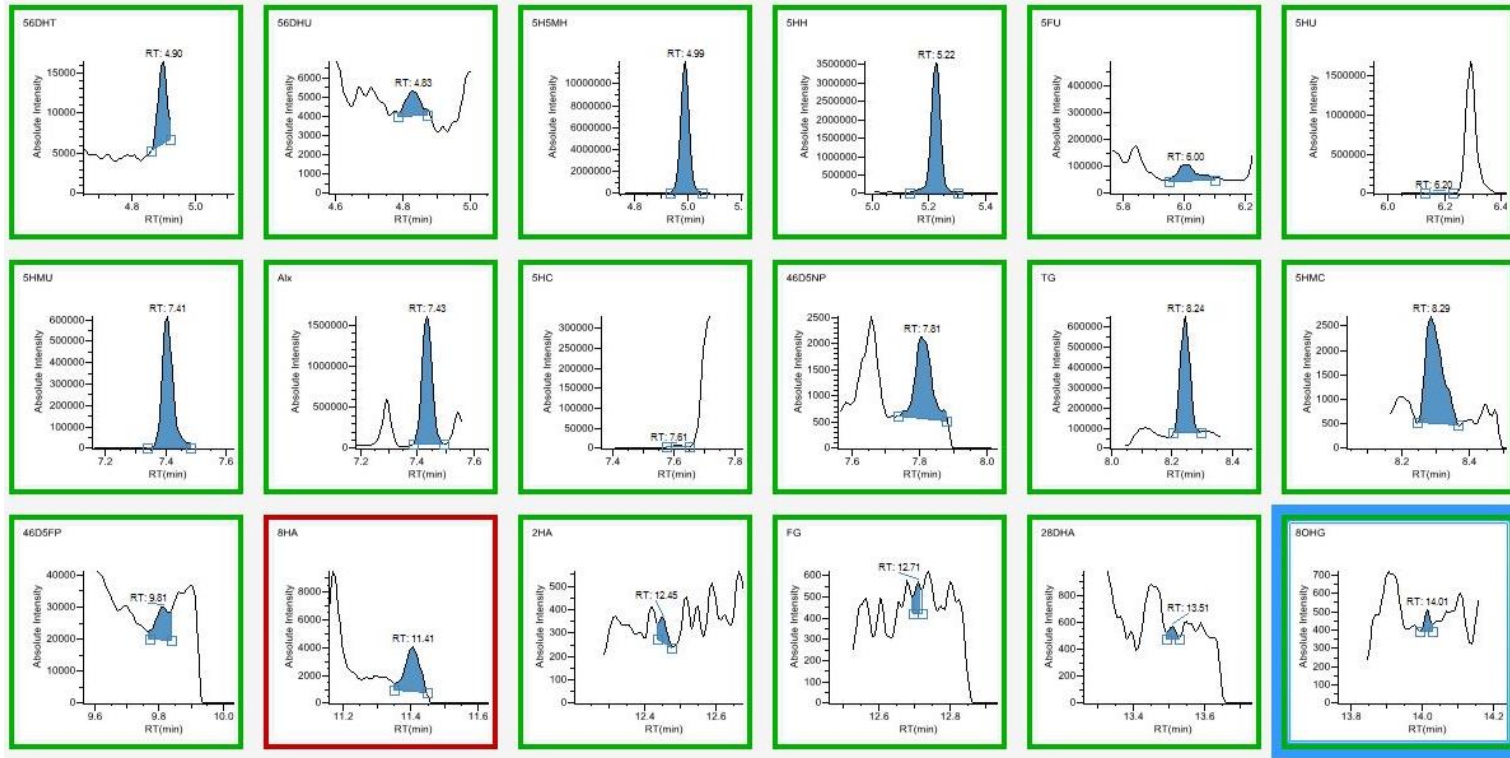
Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan buzağı timüs DNA ve optimum derişimlerde GA, KA ve RA eklenerek oksidatif strese uğratılmış DNA örnekleri Bölüm 3.2.3’te belirtildiğı gibi analiz için hazırlanmıştır. Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan buzağı timüs DNA ve optimum derişimlerde GA, KA ve RA eklenerek oksidatif strese uğratılmış buzağı timüs DNA’sının GC-MS/MS yapılan analizine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.’da görölmektedir.

Çizelge 4.6. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin validasyon parametreleri (Aybastier, 2016).

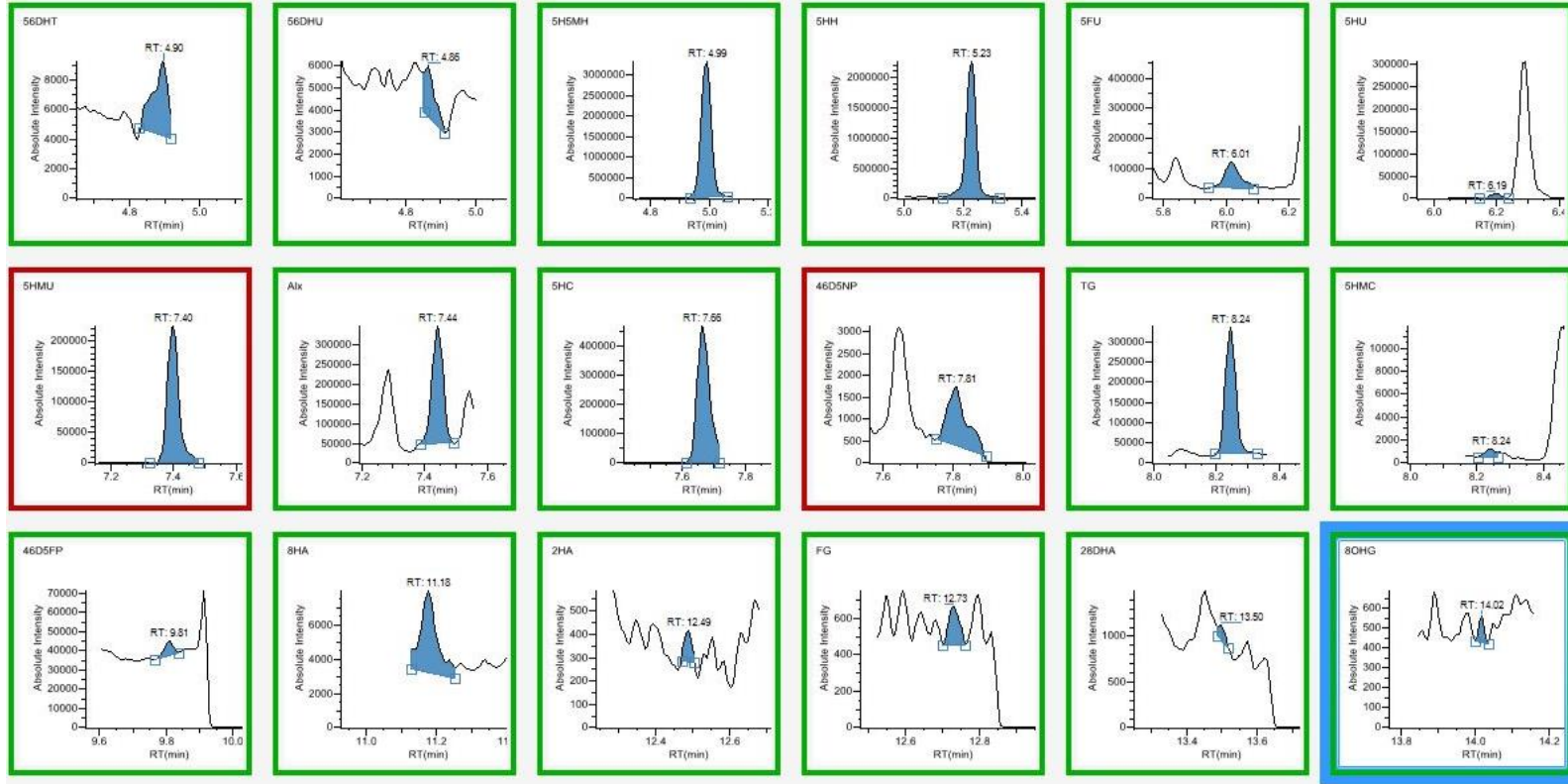
DNA baz hasar ürünü	Doğru denklemi	R ²	Derişim aralığı (µg/L)
56DHT	$y = 16646x + 18767$	0,9999	0,25-200
56DHU	$y = 29866x + 26116$	0,9999	0,25-200
5H5MH	$y = 139484x + 40828$	0,9995	0,25-200
5HH	$y = 332926x + 456151$	0,9999	0,10-200
5FU	$y = 37526x + 182000$	0,9985	0,50-200
5HU	$y = 180247x - 71952$	0,9983	0,25-200
5HMU	$y = 35141x + 5368$	0,9997	0,05-200
Alx	$y = 403716x - 448535$	0,9985	0,10-200
5HC	$y = 234156x - 344006$	0,9969	0,10-200
46D5NP	$y = 25379x - 19999$	0,9978	0,50-200
TG	$y = 650289x + 807385$	0,9966	0,10-200
5HMC	$y = 12495x - 2449$	0,9991	0,10-200
46D5FP	$y = 123507x + 139198$	0,9998	0,10-200
8HA	$y = 204511x + 825496$	0,9918	0,10-200
2HA	$y = 8172x + 55630$	0,9104	0,25-200
FG	$y = 99348x - 214935$	0,9962	0,25-200
28DHA	$y = 63055x - 139448$	0,9976	0,50-400
8OHG	$y = 82775x + 2508$	0,9874	0,10-25



Şekil 4.4. Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri (56DHT: 5,6-dihidrotimin, 56DHU: 5,6-dihidrourasil, 5H5MH: 5-hidroksi-5-metilhidantoin, 5HH: 5-hidroksihidantoin, 5FU: 5-formilurasil, 5HU: 5-hidroksiurasil, 5HMU: 5-(hidroksimetil)urasil, Alx: alloksan, 5HC: 5-hidroksisitozin, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropirimidin, TG: timin glikol, 5HMC: 5-(hidroksimetil)sitozin, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA: 8-hidroksiadenin, 2HA: 2-hidroksiadenin, FG: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-dihidroksiadenin, 8OHG: 8-hidroksiguanin)



Şekil 4.5. Folin-ciocalteu optimum koşullarında Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri (56DHT: 5,6-dihidrotimin, 56DHU: 5,6-dihidrourasil, 5H5MH: 5-hidroksi-5-metilhidantoin, 5HH: 5-hidroksihidantoin, 5FU: 5-formilurasil, 5HU: 5-hidroksiurasil, 5HMU: 5-(hidroksimetil)urasil, Alx: alloksan, 5HC: 5-hidroksisitozin, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropirimidin, TG: timin glikol, 5HMC: 5-(hidroksimetil)sitozin, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA: 8-hidroksiadenin, 2HA: 2-hidroksiadenin, FG: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-dihidroksiadenin, 8OHG: 8-hidroksiguanin)



Şekil 4.6. FRAP optimum koşullarında Fenton oksidasyonu ile oluşan DNA hasar ürünleri (56DHT: 5,6-dihidrotimin, 56DHU: 5,6-dihidrourasil, 5H5MH: 5-hidroksi-5-metilhidantoin, 5HH: 5-hidroksihidantoin, 5FU: 5-formilurasil, 5HU: 5-hidroksiurasil, 5HMU: 5-(hidroksimetil)urasil, Alx: alloksan, 5HC: 5-hidroksisitozin, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropirimidin, TG: timin glükol, 5HMC: 5-(hidroksimetil)sitozin, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin, 8HA: 8-hidroksiadenin, 2HA: 2-hidroksiadenin, FG: 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 28DHA: 2,8-dihidroksiadenin, 8OHG: 8-hidroksiguanin)

Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan örnekler için Çizelge 4.6.'da verilen validasyon parametrelerine göre oksidatif strese uğratılan buzağı timüs DNA'da oluşan baz hasar ürünleri (ng/mg DNA) hesaplanmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Fenton reaksiyonu ortamında oluşan DNA oksidatif baz hasar ürünleri (ng/mg DNA)

	DNA + Fenton	Opt. FOLİN	Opt. FRAP
56DHT	<LOD	0,24±0,07	<LOD
56DHU	<LOD	<LOD	<LOD
5H5MH	134,54±27,60	19,84±0,29	57,33±1,32
5HH	32,25±4,64	24,01±0,04	14,10±0,89
5FU	<LOD	2,47±0,07	2,59±0,25
5HU	0,85±0,06	1,15±0,03	0,54±0,09
5HMU	0,38±0,54	44,37±0,67	16,10±0,27
Alx	4,00±0,37	11,35±0,14	3,51±0,01
5HC	2,32±0,01	2,35±0,01	7,60±0,02
46D5NP	1,07±0,01	1,30±0,04	1,27±0,01
TG	0,54±0,08	1,87±0,09	1,04±0,07
5HMC	<LOD	0,50±0,02	<LOD
46D5FP	<LOD	<LOD	<LOD
8HA	<LOD	<LOD	<LOD
2HA	<LOD	<LOD	<LOD
FG	2,97±0,01	2,97±0,01	2,97±0,01
28DHA	<LOD	<LOD	<LOD
8OHG	<LOD	<LOD	<LOD
Toplam	178,93	112,43	107,06

<LOD: Tespit limitinin altında

Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan DNA örneğine sırasıyla FOLİN (7,87 μ M KA; 6,75 μ M RA; 9,42 μ M GA) ve FRAP (8,03 μ M KA; 9,34 μ M RA; 6,00 μ M GA) yöntemlerine göre merkezi kompozit dizayn ile bulunan optimum derişimler eklendiğinde, sırasıyla toplam 112,43 ve 107,06 ng/mg DNA bulunmuştur. Sayısal veriler dikkate alındığında DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin oluşumunu sırasıyla yaklaşık %37,17 (FOLİN yöntemi) ve %40,17 (FRAP yöntemi) oranında önlediği belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Flavonoidler, kimyasal yapı ve özellikleri bakımından çeşitlilik gösteren bir grup polifenolik bileşiktir. Meyve, sebze, kabuklu yemişler, tohumlar, çiçekler ve ağaç kabuklarında doğal olarak bulunurlar ve insan diyetinin ayrılmaz bir parçasıdır. Antibakteriyel, antiviral, anti-enflamatuar, antialerjik ve vazodilatör etkiler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler sergiledikleri bildirilmiştir. Flavonoidler bu etkileri temelde sahip oldukları antioksidan kapasiteleri nedeniyle, serbest radikalleri temizleyerek ve iki değerlikli katyonları şelatlayarak gösterirler.

Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri vücudumuz tarafından çeşitli endojen sistemler, farklı fizyokimyasal koşullara maruz kalma veya patolojik durumlar nedeniyle üretilir. Vücudun fizyolojik işlevlerinin normal şekilde ilerlemesi için serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki denge oldukça önemlidir. Serbest radikaller vücudun bunları düzenleme yeteneğini aşarsa, oksidatif stres olarak bilinen bir durum ortaya çıkar. Böylece serbest radikaller lipidleri, proteinleri ve DNA'yı olumsuz yönde değiştirir ve bir dizi insan hastalığını tetikler. Antioksidanların ROS kaynaklı oksidatif hasara ve buna bağlı lipid peroksidasyonuna ayrıca DNA hasarına karşı koruma sağlamada önemli bir rol oynar.

Doğal veya sentetik gıda ürünlerinde kullanılan antioksidanlar kendi aralarında etkileşime girebilir ve sinerjistik, ilave (additive) ve antagonistik etkileşimlere neden olabilir. Antioksidan vitaminler (örn., C vitamini ve E vitamini) ve fitokimyasal antioksidanlar (polifenoller ve karotenoidler vb.) dahil olmak üzere doğal olarak oluşan antioksidanlar, birleştirildiklerinde sinerjistik etkileşimlere neden olabilir ve bu nedenle gıda sistemlerinde uygulamayı kolaylaştırabilir. Doğal antioksidan kullanmanın avantajları, özellikle sinerjistik etkileşimlere sahip kombinasyonlar ciddiye alınmalıdır; doğal ve sentetik antioksidanlar arasındaki ve farklı gıda matrisleriyle olan çok yönlü etkileşimlere yönelik sistematik araştırmalar sürdürülmelidir.

Bu çalışmada kafeik asit, rosmarinik asit ve gallik asit fenoliklerinin antagonistik/sinerjistik etkileri ortaya konulmuştur. Optimizasyon tekniklerinden

merkezi kompozit dizayn kullanılarak belirlenen derişim aralığında kafeik asit, rosmarinik asit ve gallik asitin toplam antioksidan özelliğı maksimum olacak şekilde optimum derişim değeri belirlenmiştir. Optimum derişim değeri ile belirlenen toplam fenolik madde (Folin-Ciocalteu yöntemi) ve antioksidan kapasite (FRAP yöntemi) değeri tahmini değeriyle uyumlu bulunmuştur.

Belirlenen optimum derişimler de kafeik asit, rosmarinik asit ve gallik asitin buzağı timüs DNA'sında Fenton reaksiyonu ile oluşturulan hidroksil radikalının yol açacağı oksidatif hasara etkisi incelenmiştir. Buzağı timüs DNA'sı ve antioksidan içeren ortamda Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşturulmuş, DNA oksidatif baz hasar ürünleri GC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Antioksidanların varlığında DNA'da oksidatif baz hasarı oluşumunun büyük oranda engellendiğı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abuja, P. M., Abuja, P. M., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46(10), 4091-4096-1998 v.46 sy10. <https://doi.org/10.1021/jf980296g>
- Agarwal, S., Sharma, V., Kaul, T., Abidin, M. Z., & Singh, S. (2014). Cytotoxic effect of carotenoid phytonutrient lycopene on *P. falciparum* infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 197(1), 15-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.09.005>
- Ahmad, A., Syed, F. A., Singh, S., & Hadi, S. M. (2005). Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, 159(1), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.04.001>
- Ahmadi, M., Pup, M., Olariu, L., Verme^aan, H., & Prejbeanu, R. (2008). *Manganese and Zinc Overdose-Risk of Oxidative Stress Appearance*.
- Alam, Md. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, Md. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49(5), 633-649. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.996146>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademi'r, S. E., & Altun, M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, 39(9), 949-961. <https://doi.org/10.1080/10715760500210145>
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 317S-325S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.317S>
- Aybastier, Ö. (2016). *Dna'nın Oksidatif Hasarı Üzerine Fenolik Maddelerin Etkisi* (Doktora tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi. (Tez no: 459131)
- Azmi, A. S., Bhat, S. H., & Hadi, S. M. (2005). Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. *FEBS Letters*, 579(14), 3131-3135. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.077>
- 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*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., & Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778. <https://doi.org/10.1039/C0AY00245C>

- Bessho, T., Tano, K., Kasai, H., Ohtsuka, E., & Nishimura, S. (1993). Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19416-19421. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36531-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36531-7)
- Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Blanco, I. H., Hoffmann, T., Martin, H. D., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schülke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl, W., & Walsh, R. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: Carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(6), 559-568. <https://doi.org/10.1002/jsfa.849>
- Bhat, K. P. L., & Pezzuto, J. M. (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 210-229. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02918.x>
- Bhat, S. H., Azmi, A. S., & Hadi, S. M. (2007). Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.022>
- BLOIS, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. v. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91 Spec No(2), 179-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., & Dizdaroglu, M. (1992). Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31(1), 106-110. <https://doi.org/10.1021/bi00116a016>
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- Bravo, L. (1998). *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). β -Carotene: an Unusual Type of Lipid Antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573. <https://doi.org/10.1126/science.6710156>
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.-L. (1997). Artifacts Associated with the Measurement of Oxidized DNA Bases. *Çinde Environ Health Perspect* (C. 105).
- Cao, G., & Prior, R. L. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Çinde Oxidants and Antioxidants Part A* (C. 299, ss. 50-62). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99008-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99008-0)
- Chan, W. T. K., & Wong, W. T. (2013). A brief introduction to transition metals in unusual oxidation states. *Polyhedron*, 52, 43-61. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.09.004>

- Chen, Q., Graham Espey, M., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Beneda Khosh, D., Drisko, J., & Levine, M. (2008). *Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804226105
- Chung, T., Moon, S., Chang, Y., Ko, J., Lee, Y., Cho, G., Kim, S., Kim, J., & Kim, C. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, 18(14), 1670-1681. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2126com>
- Cole, G. M., Lim, G. P., Yang, F., Teter, B., Begum, A., Ma, Q., Harris-White, M. E., & Frautschy, S. A. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiology of Aging*, 26(1, Supplement), 133-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.005>
- Constantin, R. P., Constantin, J., Pagadigorria, C. L. S., Ishii-Iwamoto, E. L., Bracht, A., de Castro, C. V., & Yamamoto, N. S. (2011). Prooxidant activity of fisetin: Effects on energy metabolism in the rat liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(2), 117-126. <https://doi.org/10.1002/jbt.20367>
- Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., & Garrido, M. (2020). Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Içinde Antioxidants* (C. 9, Sayı 12, ss. 1-20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9121263>
- Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E., & Mendoza, L. (2014). In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(12), 21154-21167. <https://doi.org/10.3390/molecules191221154>
- Dandapat, J., Chainy, G. B. N., & Rao, K. J. (2003). Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology- C Toxicology and Pharmacology*, 135(3), 221-233. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00080-2)
- 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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1051, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.014>
- DeLange, R. J., & Glazer, A. N. (1989). Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: A screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry*, 177(2), 300-306. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90056-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90056-0)
- Demple, B., & Harrison, L. (1994). Repair Of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 915-948. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004411>
- Dizdaroglu, M. (1994). Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Içinde Methods in Enzymology* (C. 234,

- ss. 3-16). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34072-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34072-2)
- Dreher, D., & Junod, A. F. (1996). Review Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. İçinde *EurJ Cancer* (C. 32, Sayı 1).
- Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. İçinde *Phytotherapy Research* (ss. 1379-1391). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. İçinde *Mutation Research* (C. 475).
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gackowski, D., Rozalski, R., Roszkowski, K., Jawien, A., Foksiński, M., & Olinski, R. (2001). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet. *Free Radical Research*, 35(6), 825-832. <https://doi.org/10.1080/10715760100301321>
- Garazd, M. M., Garazd, Ya. L., & Khilya, V. P. (2003). Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties. *Chemistry of Natural Compounds*, 39(1), 54-121. <https://doi.org/10.1023/A:1024140915526>
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 29-36. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00102-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00102-P)
- Gupta, U. C., & Gupta, S. C. (1998). Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: implications for management. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29(11-14), 1491-1522. <https://doi.org/10.1080/00103629809370045>
- Güven, H., Arici, A., & Simsek, O. (2019). Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2019.555>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. İçinde *Plant Physiology* (C. 141, Sayı 2, ss. 312-322). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hanif, S., Shamim, U., Ullah, M. F., Azmi, A. S., Bhat, S. H., & Hadi, S. M. (2008). The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. *Toxicology*, 249(1), 19-25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.024>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>

- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., & van de Putte, Betty. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1242-1246. <https://doi.org/10.1021/jf00032a015>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. İçinde *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (C. 53, Sayı 6, ss. 1841-1856). <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Karkar, B., & Şahin, S. (2022). Determination of phenolic compounds profiles and antioxidant properties of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) grown in Turkey. *European Food Research and Technology*, 248(1), 219-241. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03875-y>
- Karkar, B., Şahin, S., & Güneş, M. E. (2018). Antioxidative Effect of Turkish Chestnut Bee Pollen on DNA Oxidation System and Its Phenolic Compounds. *Gıda/The Journal Of Food*, 43(1), 34-42. <https://doi.org/10.15237/gida.gd17055>
- Kashiwada, Y., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Tanaka, T., Nonaka, G., Cosentino, L. M., Snider, J. v, & Lee, K.-H. (1995). Anti-AIDS Agents, 18. Sodium and Potassium Salts of Caffeic Acid Tetramers from *Arnebia euchroma* as Anti-HIV Agents. *Journal of Natural Products*, 58(3), 392-400. <https://doi.org/10.1021/np50117a007>
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2004). Antioxidant Properties of Carotenoids In Vitro and In Vivo. *Food Reviews International*, 20(2), 99-121. <https://doi.org/10.1081/FRI-120037155>
- Kondakçı, E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and e using a modified CUPRAC method. *Talanta*, 115, 583-589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.006>
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Lovell, D. P., & Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 171-182. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen015>
- Lyle, B. J., Mares-Perlman, J. A., Klein, B. E. K., Klein, R., & Greger, J. L. (1998). Supplement Users Differ from Nonusers in Demographic, Lifestyle, Dietary and Health Characteristics. *The Journal of Nutrition*, 128(12), 2355-2362. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2355>
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2603>
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>

- Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., & Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritional and Health Aspects in Humans 11The method development and synthesis of the standards and deuterium-labelled compounds was supported by National Institutes of Health Grants No. 1 R01 CA56289-01 and No. 2 R01 CA56289-04, and analytical work by the EU research contract FAIR-CT95-0894. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(4), 193-200. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(97\)00184-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00184-8)
- McCallum, J. L., Yang, R., Young, J. C., Strommer, J. N., & Tsao, R. (2007). Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, 1148(1), 38-45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.088>
- Mecocci, P., Polidori, M. C., Cherubini, A., Ingegneri, T., Mattioli, P., Catani, M., Rinaldi, P., Cecchetti, R., Stahl, W., Senin, U., & Beal, M. F. (2002). Lymphocyte Oxidative DNA Damage and Plasma Antioxidants in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 59(5), 794-798. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.5.794>
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. dos, Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127-130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.687>
- Michaluart, P., Masferrer, J. L., Carothers, A. M., Subbaramaiah, K., Zweifel, B. S., Koboldt, C., Mestre, J. R., Grunberger, D., Sacks, P. G., Tanabe, T., Dannenberg, A. J., & Weill, S. I. (1999). Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Activity and Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Oral Epithelial Cells and in a Rat Model of Inflammation 1. *İçinde Cancer Research (C.59)*. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/59/10/2347/3245616/ch109902347p.pdf>
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., & Ikeda, T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1569(1), 35-44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00230-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00230-6)
- Mortensen, A., Skibsted, L. H., Sampson, J., Rice-Evans, C., & Everett, S. A. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Letters*, 418(1-2), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01355-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01355-0)
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184-187. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90658-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90658-J)

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. İçinde *Journal of Nutritional Science* (C. 5). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pevec, A. Z., Šlejkovec, Z., Elteren, J. T. V., & Falnoga, I. (2012). As₂O₃ oxidation by vitamin C: Cell culture studies. *BioMetals*, 25(1), 103-113. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9486-6>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. İçinde *Journal of Natural Products* (C. 63, Sayı 7, ss. 1035-1042). <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Schröder, N., & Rechkemmer, G. (1999). Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. İçinde *Eur J Nutr* (C. 38).
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044138>
- Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Krogholm, K. S., & Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. İçinde *Molecular Nutrition and Food Research* (C. 49, Sayı 2, ss. 159-174). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400082>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Scheit, K., & Bauer, G. (2014). Direct and indirect inactivation of tumor cell protective catalase by salicylic acid and anthocyanidins reactivates intercellular ROS signaling and allows for synergistic effects. *Carcinogenesis*, 36(3), 400-411. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv010>
- Shadreck, M., & Mugadza, T. (2013). *African Journal of Pure and Applied Chemistry Chromium, an essential nutrient and pollutant: A review*. 7(9), 310-317. <https://doi.org/10.5897/AJPAC2013>
- Shigenaga, M. K., Aboujaoude, E. N., Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). [2] Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. İçinde *Methods in Enzymology* (C. 234, ss. 16-33). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34073-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34073-0)
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., & Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125(2), 204-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.061>

- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., & Todorović, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327-2340. <https://doi.org/10.3390/12102327>
- Sinden, R. R. (1994). *DNA Structure and Function*. Elsevier Science. <https://books.google.com.tr/books?id=Q6Yd-qYvx9UC>
- Szkudelska, K., & Nogowski, L. (2007). Genistein—A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1), 37-45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.01.005>
- Tanaka, T., Nishikawa, A., Shima, H., Sugie, S., Shinoda, T., Yoshimi, N., Iwata, H., & Mori, H. (1990). *Inhibitory Effects of Chlorogenic Acid, Reserpine, Polyprenic Acid (E-5166), or Coffee on Hepatocarcinogenesis in Rats And Hamsters Abstract*.
- Tomczyk, M., Bazyłko, A., & Staszewska, A. (2010). Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*, 21(2), 174-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.1174>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. İçinde *Nutrients* (C. 2, Sayı 12, ss. 1231-1246). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tsao, R. (2015). Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. İçinde *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (ss. 335-347). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00013-0>
- Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., & Zhu, H. (2003). Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347-6353. <https://doi.org/10.1021/jf0346298>
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. İçinde *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (C. 13, Sayı 1, ss. 12-23). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wätjen, W., & Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. İçinde *BioMetals* (C. 17).
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., & Lebowitz, M. (2002). Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Letters*, 185(1), 21-29. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00240-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00240-9)
- Whited, M. T., Mankad, N. P., Lee, Y., Oblad, P. F., & Peters, J. C. (2009). Dinitrogen Complexes Supported by Tris(phosphino)silyl Ligands. *Inorganic Chemistry*, 48(6), 2507-2517. <https://doi.org/10.1021/ic801855y>
- Yang, B., Chen, F., Hua, Y., Huang, S. S., Lin, S., Wen, L., & Jiang, Y. (2012). Prooxidant activities of quercetin, p-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 131(2), 508-512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.014>
- Yeh, S.-L., & Hu, M.-L. (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(11), 548-554. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00117-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00117-0)

- Yen, G. C., Duh, P. der, Tsai, H. L., & Huang, S. L. (2003). Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(6), 1215-1222. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1215>
- Yordi, E. G., Molina Pérez, E., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). *Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence*. www.intechopen.com
- Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Htay, H. H., Tsubouchi, R., Qiao, S. lou, Li, W. H., Murakami, K., & Yokochi, T. (2004). Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicology in Vitro*, 18(6), 783-789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.009>
- Yoshino, M., Ito, M., Haneda, M., Tsubouchi, R., & Murakami, K. (1999). Prooxidant action of aluminum Ion – Stimulation of iron-mediated lipid peroxidation by aluminum. *Biometals*, 12(3), 237-240. <https://doi.org/10.1023/A:1009238732287>
- Youssef, M. M., Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review probiotic properties of lactic acid bacteria View project Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Içinde Alex. J. Fd. Sci. & Technol* (C. 11, Sayı 1). <https://www.researchgate.net/publication/274669600>
- Zhang, P., & Omaye, S. T. (2001). β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(1), 38-45. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00143-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00143-1)
- Zhang, Y., Wu, S., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q., Ren, F., & Zhang, H. (2018). Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 240, 1072-1080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.100>
- Zhao, F., Watanabe, Y., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K., & Kitanaka, S. (2005). Prenylflavonoids and Phloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Natural Products*, 68(1), 43-49. <https://doi.org/10.1021/np0499113>
- Zheng, L.-F., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z.-L. (2008). Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure–activity relationship. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 149-156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.010>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem BAYAÇLI
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / 30.09.1997
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : Yeşilyayla Anadolu Teknik Lisesi
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi/Analitik Kimya Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : RB Karesi İthalat İhracat Tekstil Sanayi ve Ticaret A.Ş.

İletişim (e-posta) : gizeeemb@gmail.com

Yayınları : -

Kongreler :
Bayaçlı, G., Şahin, S. (2022, Eylül, 7-11). Fenolik Bileşiklerin Sinerjik Etkilerinin Analitik Yöntemlerle İncelenmesi. 10. Ulusal Analitik Kimya Kongresi Özet Bildiri Kitabı, Muğla, Türkiye. (Poster Sunumu)
Bayaçlı, G., Karkar, B., Şahin, S. (2022, Kasım 3-6). Determination of Phenolic Compounds in Avocado (Persea americana) and Their Antioxidant Effects on DNA Oxidation System. 4. Eurasia Biochemical Approaches and Technologies Congress Özet Bildiri Kitabı, Antalya, Türkiye. (Poster Sunumu)