

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**BADEM (*Amygdalus trichamygdalus*) MEYVESİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA HASARI VE PROTEİN OKSİDASYONU
ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: İsmet MEYDAN
DANIŞMAN: Prof.Dr. Halit DEMİR

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**BADEM (*Amygdalus trichamygdalus*) MEYVESİNİN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA HASARI VE PROTEİN OKSİDASYONU
ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: İsmet MEYDAN

Bu çalışma VAN YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FDK-2017-5305 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı'nda Prof.Dr. Halit DEMİR danışmanlığında, İsmet MEYDAN tarafından sunulan “ Badem (*Amygdalus trichamygdalus*) Meyvesinin Antioksidan Aktivitesi, Oksidatif DNA Hasarı ve Protein Oksidasyonu Önleyici Etkisinin Araştırılması” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 09/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve ... Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr .Nihat MERT

İmza:

Üye: Prof.Dr. Halit DEMİR

İmza:

Üye: Prof.Dr. İbrahim YÖRÜK

İmza:

Üye: Doç.Dr .Müslüm KUZU

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr. Hatice

KIZILTAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/02/2018 tarih ve 2018/10-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Prof.Dr. Süleyman KIZILTAŞ
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

İsmet MEYDAN



ÖZET

BADEM (*Amygdalus trichamygdalus*) MEYVESİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA HASARI VE PROTEİN OKSİDASYONU ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MEYDAN, İsmet
Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Halit DEMİR
Şubat 2018, 71 sayfa

Bu çalışmada Diyarbakır ilinin Eğil ilçesi ve çevresinde kültür olarak yetiştirilen badem meyvesinin (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının antioksidan aktivitesi ve oksidatif DNA hasarı ile protein oksidasyonu önleyici etkisi incelendi.

Çalışmada *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının toplam fenolik ve flavanoid bileşen miktarları incelendi. Standart fenolik olarak gallik asit ve standart flavonoid olarak quercetin kullanıldı. Etanol ekstraktının 0.5 mg/ml'nin içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 28.16 ± 9.990 µg/ml gallik aside eş değer ve toplam flavonoid bileşen miktarı 8.86 ± 0.208 µg/ml quercetine eş değer olarak bulundu. *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının FeCl₂-H₂O₂ sisteminde lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali aktivitesine bakıldı. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi 2000 µg/ml konsantrasyonda % 84.47 ± 0.147 olarak bulunurken, *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının H₂O₂/Fe⁺³/askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasarı, 500-2000 µg /ml konsantrasyon aralıklarında en düşük ve en yüksek değerler % 32.47 ± 0.94 – 76.27 ± 1.14 önlediği belirlendi. Ayrıca ekstraktın DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisi 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralıklarında %11.76 - % 50.26 olarak bulundu. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının iyi bir antioksidan olduğu, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını önleme aktivitesinin çok iyi olduğu tez çalışmaları sonucunda görüldü.

Anahtar Kelimeler: *A. trichamygdalus*, Antioksidan aktivite, Badem, Lipit peroksidasyonu, Oksidatif DNA hasarı, Protein oksidasyonu, Serbest Radikaller

ABSTRACT

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, OXIDATIVE DNA DAMAGE AND PROTEIN OXIDATION INHIBITION EFFECT OF ALMOND (*Amygdalus trichamygdalus*) FRUIT

MEYDAN, İsmet
PhD Thesis, Chemistry Department
Supervisor : Prof. Dr. Halit DEMİR
February 2018, 71 page

In this study, antioxidant activity and oxidative DNA damage and protein oxidation inhibition effect of the ethanol extract of cultivated almond fruit (*A. trichamygdalus*) were investigated that is grown in Eğil district of Diyarbakır province.

In this study the total amount of phenolic and flavanoid components of the ethanol extract of *A. trichamygdalus* fruit was investigated. Gallic acid was used as the standart phenolic and quercetin were used as the standart flavonoid. It was found that the total phenolic component content of the ethanol extract at 0.5 mg / ml was equivalent to 28.16 ± 9.990 $\mu\text{g/ml}$ gallic acid and the total flavonoid component content was equivalent to 8.86 ± 0.208 $\mu\text{g/ml}$ quercetin. The activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was investigated. *A. trichamygdalus* ethanol extract was found to have the activity of inhibiting lipid peroxidation in the $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ system. While the extinguishing activity of the DPPH radical of the ethanol extract of fruit was found to be $\% 84.47 \pm 0.147$ at 2000 $\mu\text{g/ml}$ concentration, The oxidative damage induced by *A. trichamygdalus* ethanol extract in the $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{3+} / \text{ascorbic acid}$ system and Bovine Serum Albumin (BSA) protein was found to be between $\%32.47 \pm 0.94 - 76.27 \pm 1.14$ in the concentration range of 500-2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$. In addition, the protective effect of extract on the OH radical, which is the result of H_2O_2 photolysis of DNA, was found to be between $\%11.76$ and $\%50.26$ in the range of 50-1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ concentration. It was seen as a result of thesis studies that the ethanol extract of *A. trichamygdalus* fruit was a good antioxidant and the activity of lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage inhibition were very good.

Keywords: *A. trichamygdalus*, Almond, Antioxidant activity, Lipid peroxidation, Oxidative DNA damage, Protein oxidation, Free radicals

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof.Dr. Halit DEMİR ve Prof.Dr. Murat KIZIL'a teşekkür ederim.

Tez izleme komisyonunda olan ve tez ile ilgili desteklerini esirgemeyen sayın Prof.Dr. Nihat MERT ve Prof.Dr. İbrahim Hakkı YÖRÜK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan badem meyveinin tür teşhisini yapan Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Öğretim Üyesi, Yrd.Doç.Dr. Fazlı ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoorganik laboratuvarında her türlü desteği sunan Prof. Dr. Göksel KIZIL, Dr. Bircan ÇEKEN(TOPTANCI), Dr. Sevil EMEN (TANRIKUT) Dr. Hayrettin DİNÇ ve Nesrin İNCEÖREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez VAN YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FDK-2017-5305 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim

Tezde bazı teknik işlerde bana yardımcı olan ve aynı zamanda manevi desteğini esirgemeyen çok değerli eşim Ayşegül Feray MEYDAN, doktora sürecinde dünyaya gelen ve bana dünyanın en güzel duygularını yaşatan biricik oğlum Cihan Doruk MEYDAN ve bu süreçte yanımda olan tüm dostlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

2018

İsmet MEYDAN



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ixi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	5
2.1. Serbest Radikal Nedir? Serbest Radikallerin Etkileri Nelerdir?.....	5
2.1.1. Serbest radikaller-Reaktif Oksijen türleri nelerdir?	5
2.1.1.1. Süperoksit radikali (O ₂ ⁻).....	5
2.1.1.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	5
2.1.1.3. Hidroksil (*OH) radikali	6
2.1.1.4. Nitrik oksit (NO*) radikali	6
2.2. Serbest Radikallerin Etkileri ve Oksidatif Stres	7
2.2.1. Serbest radikallerin DNA hasarı üzerine etkileri	8
2.2.2. Serbest radikal ve protein oksidasyonu üzerine etkisi	9
2.2.3. Serbest radikal ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi	11
2.3. Serbest Radikallere Karşı Antioksidanlar Etkisi.....	12
2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	13
2.3.1.1. Enzimatik antioksidanlar.....	13
2.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	15
2.4. Badem Meyvesinin Botanik Özelliği, Yayılışı ve Kullanım Alanları.....	19
3.MATERYAL VE METOT.....	23
3.1. Materyal	23
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Meyvenin etanol ekstraktının hazırlaması	25
3.2.2. Toplam fenolik bileşen miktar tayini	26
3.2.3. Toplam flavonoid bileşen miktar tayini	27

3.2.4. DPPH radikalini söndürme aktivitesi	28
3.2.5. Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi.....	29
3.2.6. Protein oksidasyonu önleme aktivitesi - SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	30
3.2.7. DNA oksidasyonu önleme aktivitesi-agaroz jel elektroforezi	32
4.BULGULAR	36
4.1. Toplam fenolik bileşen miktarı.....	36
4.2. Toplam flavonoid bileşen miktarı.....	37
4.3. DPPH radikalini söndürme aktivitesi:.....	38
4.4. Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi	40
4.5. Protein oksidasyonu önleme aktivitesi - SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	43
4.6. DNA oksidasyonu önleme aktivitesi-Agaroz jel elektroforezi	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	24
Çizelge 3.3. Protein oksidasyonunda elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları (Badem için).....	31
Çizelge 3.4. Protein oksidasyonunda elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları (BHA için).....	31
Çizelge 3.5. DNA jel elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları.....	33
Çizelge 3.6. DNA jel elektroforez bakır varlığında veya yokluğunda kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları.....	34
Çizelge 4.1. <i>A. trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının DNA hasarı üzerine olan etkisinin incelenmesi.....	48
Çizelge 4.2. <i>A. trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının bakır varlığında yada yokluğunda DNA kesimi üzerine olan etkisinin incelenmesi	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar.....	7
Şekil 2.2. Mutasyona uğramış DNA yapısı.....	9
Şekil 2.3. Protein oksidasyonunun oluşumu.....	10
Şekil 2.4. Lipit Peroksidasyon sonucunda malondialdehitin oluşması.....	12
Şekil 2.5. Fazla elektrona sahip olan antioksidanların kararsız yapıdaki serbest radikallere elektron vererek radikalleri etkisiz hale getirmesi.....	13
Şekil 2.6. BHA, BHT ve TBHQ antioksidanlarının yapıları.....	15
Şekil 2.7. NDGA'nın yapısı	15
Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitin yapısı.....	16
Şekil 2.9. Hidroksisinnamik asit.....	17
Şekil 2.10. Flavonoidlerin genel yapısı.....	17
Şekil 2.11. Askorbik asit(C vitamini).....	18
Şekil 2.12. Takoferollerin genel yapısı.....	19
Şekil 2.13. β -Karoten genel yapısı.....	19
Şekil 2.14. Badem (<i>Amygdalus trichamygdalus</i>) meyvesi.....	22
Şekil 3.1. Etanol ekstraktının hazırlanması (a) karıştırma işlemi, (b) süzme işlemi.....	25
Şekil 3.2. Evapratör ile yağ ayırma işlemi.....	25
Şekil 3.3. Gallik asit.....	27
Şekil 3.4. Quarcetin.....	28
Şekil 3.5. DPPH.....	29
Şekil 3.6. Tiyobarbitürik asit (TBA).....	30
Şekil 3.7. DNA'nın formları ve kırıkların şekilsel olarak gösterimi.....	32
Şekil 4.1. Gallik asidin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorban değerleri.....	37
Şekil 4.2. Quartenin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorban değerleri.....	38
Şekil 4.3. <i>A. trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonu için farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali	

Şekil	Sayfa
üzerindeki söndürücü etkisi grafiği.....	39
Şekil 4.4. <i>Amygdalus trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının yüksek konsantrasyonu için farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi grafiği.....	40
Şekil 4.5. <i>Amygdalus trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonda lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin grafiği.....	42
Şekil 4.6. <i>Amygdalus trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının yüksek konsantrasyonda lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin grafiği.....	43
Şekil 4.7. <i>A. trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının BSA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisinin Sodyumdodesilsülfat-poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmesi.....	44
Şekil 4.8. BHT' nin BSA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisinin Sodyumdodesilsülfat-poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmesi.....	45
Şekil 4.9. Her kuyucuktaki pBR322 plazmid DNA'nın sc-DNA (Form I), oc-DNA (Form II) ve I-DNA (Form III) yüzdeleri.....	47
Şekil 4.10. <i>A. trichamygdalus</i> meyvesinin etanol ekstraktının bakır yokluğunda ve varlığında DNA üzerine etkisinin incelenmesi.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit
$\cdot OH$	Hidroksil
$ROO\cdot$	Peroksil
$RO\cdot$	Alkoksil
$NO\cdot$	Nitrik oksit
$HOCl$	Hipoklorit asit
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Fe	Demir
Cu	Bakır
Zn	Çinko
Co	Kobalt
Cr	Krom
Mn	Mangan
Ni	Nikel
Mo	Molibden
$ONOO^-$	Peroksinitrit
A°	Absorbans
μg	Mikrogram
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklama

DNA	Deoksiribo nükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismütaz
UV	Ultraviyole
MDA	Malondialdehit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSH	Yükseltgenmiş glutasyon
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
PG	Propil galat
TBHQ	Tersiyer bütül hidro kinon
A.t.	<i>Amygdalus trichamygdalus</i>
<i>A. trichamygdalus</i>	<i>Amygdalus trichamygdalus</i>
TAE	Tris asetat
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazin
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel
BSA	Bovin serum albümin
F-C	Folin-Ciocalteu
CAT	Katalaz
HS	<i>Hypericum scabroides</i>
HT	<i>Hypericum triquetrifolium</i>
TCA	Trikloroasetik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
c.v.	Cultivated variety (kültür bitkisi)

1.GİRİŞ

Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında ya da bazı dış etmenlere bağlı olarak oluşabilen molekül yapılarıdır. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak ifade edilebilir (Kopani ve ark., 2006). Serbest radikallerin molekül yapılarında eksik elektron bulunduğu ve yüksek enerjili yapılara sahip olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, bu durumlarından dolayı kararlı yapıya geçebilmek için hücre içerisinde DNA, lipid, protein v.b. gibi yapılara saldırarak çok ciddi zararlara neden olabilmektedirler. Serbest radikallerin oluşum mekanizmalarını engellemek neredeyse imkânsızdır. Fakat meydana gelen zararları minimize edebilmek için yapılabilecek çok önemli şeyler vardır. Sigara, alkol tüketimi, hava kirliliği, stres, radyasyon, UV ışınları gibi kötü ortam koşulları, vücudumuzda serbest radikal oluşumunu hızlandıran etmenlerden uzak durarak ya da dikkat ederek zararları minimize edilebilir. Serbest radikallerin bu zararları engellenemezse çok ciddi hastalıklar ortaya çıkabilir. Bu hastalıkların başında: kanser, ateroskleroz, diyabet, Alzheimer, yaşlanma gibi birçok hastalık gelebilir (Dilas ve Canadanoviç, 2012).

Serbest radikallerin zararlarını minimize eden ve engelleyen diğer bir ifadeyle serbest radikallerin baş düşmanı olan yapılar antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar yapılarında serbest radikallerin aksine fazla elektron bulundurlar ve serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için bu elektronlarını serbest radikallere aktarırlar. Böylelikle serbest radikallerin kararlı yapıya ulaşmaları sağlanarak bir bakıma etkisizleştirilirler (Halliwell, 1995).

İnsanoğlu tüketmiş oldukları gıdaların özellikle bitkilerin içerisindeki bazı bileşenlerinin insan sağlığı için çok faydalı olduğunu, son zamanlarda yapılan çalışmalarla anlamaya başlamışlar. İçerilerinde doğal antioksidan olduğunu da yaptıkları çalışmalarla ortaya çıkarmışlardır. Yapılan çalışmalarda gıdaların içerisinde bulunan bileşenlerin birçok hastalıkla doğrudan ilişkili olduğu özellikle de kanserle ilgisi olduğu anlaşılmıştır (Bruce, 1987).

Aslında bitkilerde bu kadar antioksidan bulunması çokta şaşırtıcı değildir. Çünkü doğada mevcut olan bitki sayısı üç yüz bin'in üzerindedir. İnsanoğlunun besin olarak tükettiği bitki sayısı bin tane değildir. Bu besin kaynağı olarak tüketmiş olduğumuz bitkilerin çoğunun antioksidan içerikleri henüz araştırılmamıştır. Antioksidan içerikleri keşfedilmiş olan bitkilerin içerisindeki kimyasal bileşikler, fenolik bileşikler, flavonoidler, bazı aminoasitler, karoteonidler, A ve C vitaminleri, organik asitler, glukonadlar, terpenler, kumarinler, sülfidlar, fitatlar, melonoidler, izotiyosiyanatlar, ligninler ve indollerdir. Bu sayılan moleküller diyetle alındıktan sonra insan vücudunda meydana gelebilecek zararlara (kansere, ateroskleroz, diyabet, Alzheimer, yaşlanma gibi.) karşı engelleyici olarak rol almaktadırlar (Nagy ve Attaway, 1992). Bitki kökenli olan moleküllerin antioksidan aktiviteleri genel olarak yapılarındaki flavonoidlerden kaynaklanır (Heim ve ark. 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarda fitokimyasal bileşiklerin kansere karşı çok güçlü önleyici etkiye sahip olduğu ve kullanım alanlarının gittikçe arttığı görülmektedir. Fitokimyasallardan alkoloidler ve fenolikler özellikle kanser ve tümöre karşı güçlü önleyici etkiye sahiptirler (Pillia, 2004).

Yıllar geçtikçe bitkilerle yapılan çalışmalar daha da önemli hale gelmiştir. Bitkilerden elde edilen maddelerden doğal ilaç üretimi sağlanabilmesinden dolayı bitkilere olan ilgi artırmıştır (Baytop, 1984).

Ülkemizde badem hemen hemen her yerde tohum olarak ekilebilen ya da yetiştirilebilen bir ağaç meyvesidir. Ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesi başta olmak üzere Ege ve Akdeniz bölgelerinde de çok ciddi bir şekilde yetiştirebilmektedir. Badem gülgiller ailesinde olup çok hoş çiçekleri olan küçük bir ağacın meyvesidir. Badem meyvesi sert ve kabukludur. Badem ülkemizde olduğu gibi dünyanın birçok bölgesinde kuruyemiş olarak çok fazla tüketilmektedir. Badem çok ciddi miktarda mineral ve vitamin içerir ve birçok hastalığa iyi geldiği için çok eski zamanlardan beri tüketilmektedir. Örneğin badem yağı hem cilt için hem de kabız çocuklar için kabızlığı giderici olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır. Aynı zamanda acı bademin kalp ve damar hastalıklarına karşı kişileri koruyan ve diyabet hastalarında dengeleyici bir etkiye sahip ideal bir kuruyemiş olduğu bilinmektedir. Bunların yanında balgam sökücü etkisi, dalak ve ciğerden çıkan damarları açma, cinsel isteği artırma, cilt enfeksiyonlarına neden olan etkileri azaltma, bronş ve boğaz ağrıları giderme gibi birçok faydası olduğu söylenmektedir.

Bu çalışmada, Diyarbakır (Eğil) civarlarında toplanan badem (*A. trichamygdalus*) meyvelerinden elde edilen etanol ekstraktının serbest radikaller tarafından oluşturulan DNA hasarı üzerine engelleyici-önleyici etkisinin varlığı, aynı zamanda protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonları üzerine muhtemel etkilerini incelemek amaçlanmıştır.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Serbest Radikal nedir? Serbest Radikallerin Etkileri Nelerdir?

Serbest radikaller, yapılarında çok sayıda ortaklanmamış elektron bulunduran yüksek enerjili ve kısa ömürlü kararsız yapılardır. Eksik elektronlarını tamamlamak için genellikle bu radikaller hücre içerisindeki birçok moleküle (DNA, Protein, Lipid v.b.) saldırarak elektronlarını tamamlamak ve kararlı yapıya ulaşmak için bu yapılara zarar verirler. Bu serbest radikaller belirli fizyolojik ve patolojik durumlar da oluşmaktadır. İnsanlarda serbest radikal oluşması gayet olağan bir durum olmakla birlikte, nefes alıp verme, beslenme gibi fizyolojik durumlarda vücut içerisine bu radikallerin girmesinden hiçbir şekilde kaçınılamamaktadır. Sigara, stres, kötü beslenme, hava kirliliği, radyasyon serbest radikallerin oluşumunda çok ciddi rol oynamaktadırlar. Ancak bu durumlar mümkün olduğu kadar minimize edilerek zararlarından korunmak söz konusu olabilir. Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemli kaynağı, oksijenli solunum esnasında meydana gelen oksijen radikalleridir (Akkuş, 1995).

2.1.1. Serbest radikaller-reaktif oksijen türleri nelerdir?

Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içinde süperoksit, singlet oksijen, hidroksil vb. reaktif oksijen türlerini (ROT) açığa çıkarmaktadır. Süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (ROO), alkoksil (RO) ve nitrik oksiti (NO) kapsayan oksijen merkezli serbest radikal örnekleri ile ve singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorit ($HOCl$) gibi radikal olmayan türler reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen bileşiklerdir. Fizyolojik şartlarda bu yapılar vucut için gerekli olup aşırı derecede üretilmeleri vücut için tehdit oluşturup ve birçok hastalığa (kanser, kronik kalp, Alzheimer, erken yaşlanma gibi) neden olabilmektedirler. Ancak bunların söndürülmeleri ile bu tür kötü etkilerin önüne geçilmesi mümkündür (Stahl ve ark., 1993).

2.1.1.1. Süperoksit radikali (O₂⁻)

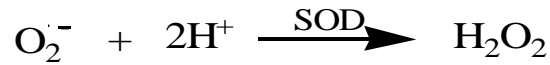
Singlet oksijenler biyolojik olarak meydana gelen oksijenlerin uyarılmış halleridir (Stahl ve ark., 1993). Oksijenin elektron transfer sisteminde kullanımı esnasında tüketilen oksijenin yaklaşık olarak % 1-5 arasında süperoksit radikali olarak açığa çıkmaktadır (Kılınç ve ark., 2002). Süperoksit radikalleri oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü olarak kabul edilir ve enzimatik reaksiyonlarda çok fazla üretilmektedirler. Genel olarak organizmalarda bilinen radikal ve radikal olmayan reaktif türlerin oluşmasında önemli görevi vardır. Süperoksit radikalleri çevresel etkenler (radyasyon, hava kirliliği, ağır metaller) ya da aerobik metabolizmalarda normal bir yan ürün olarak oluşabilmektedir. Süperoksit radikalleri, oksijen moleküllerinin bir elektron alması sonucunda oluşur (Aruoma, 1998).

Neredeyse bütün aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda kararsız bir yapı olan süperoksit radikalleri oluşur (Buonocore ve ark., 2010).

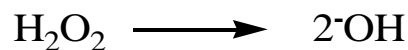


2.1.1.2 . Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksitin (H₂O₂) zayıf bir ROT olduğu bilinmektedir. Süperoksit radikali hidrojen ile tepkimeye girerek H₂O₂ oluşturur.



Hidrojen peroksit serbest radikal değildir, fakat oluşan serbest oksijen radikalleri zararlı bir maddedir. Aynı zamanda fizyolojik miktarı organizma için çok önemli görevler üstlenmektedir. Bazı geçiş metalleri ile özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında süperoksit radikalleri ile tepkimeye girer ve çok zararlı bir oksijen radikali olan hidroksil radikaline dönüşebilir (Malo ve ark., 2000).



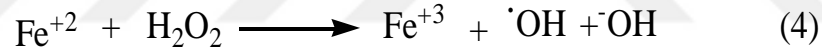
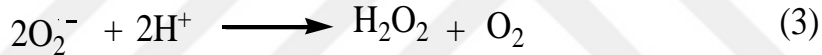
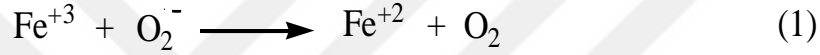
2.1.1.3. Hidroksil ($\cdot\text{OH}$) radikali

Hidroksil radikalinin oksidan gücü, reaktif oksidan türleri içerisinde neredeyse en fazla olan radikaldir. Biyolojik yada kimyasal olarak üretilen hidroksil radikali canlı sistemlerine farklı yollarla üretilirler (Buonocore ve ark., 2010).

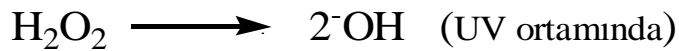
1. Genellikle sulu ortamlarda radyasyonun etkisiyle oluşabilir.



2. Fenton reaksiyonu: genellikle hidrojen peroksidin (H_2O_2) başta demir (Fe^{+2}) olmak üzere bazı geçiş metallerinin varlığında (Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Ni, Mo) indirgenmesi sonucunda hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oluşur.

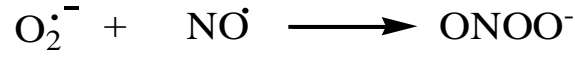


3. Hidrojen peroksidin UV ışına maruz kaldığı zaman $\cdot\text{OH}$ radikali oluşabilir.



2.1.1.4. Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) radikali

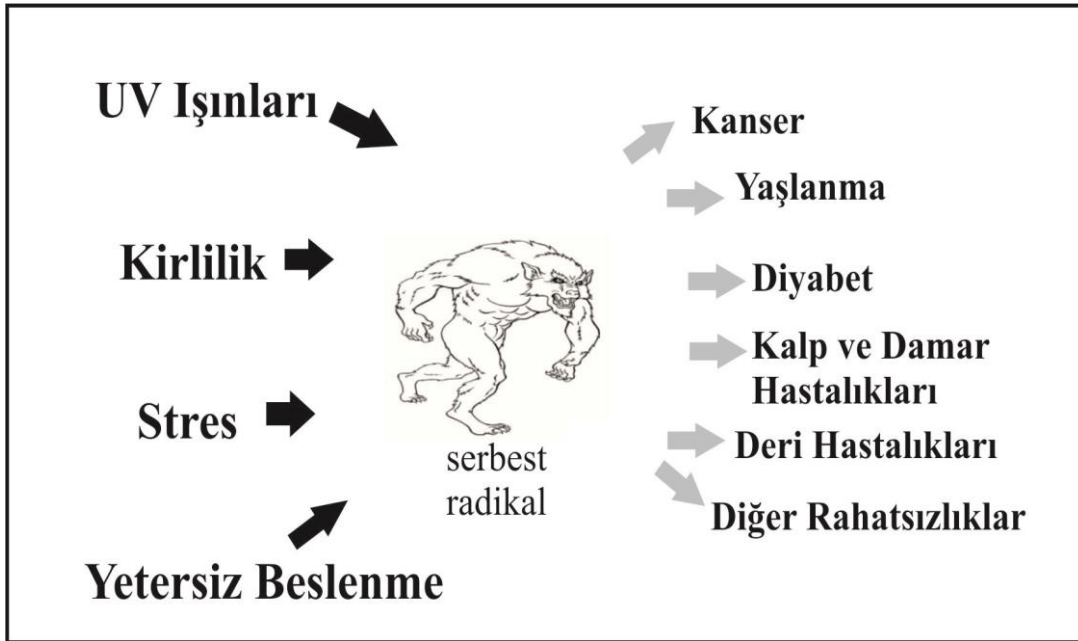
Nitrik oksit, süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluşur. Reaksiyon sonucunda nitrik oksidin etkisi inhibe edilmiş olur ve oksidatif bir etki ortaya çıkar.



Peroksinitritler (ONOO^-) protein yapılarına doğrudan zarar verecek etkiye sahiptirler. Aynı zamanda toksik yapıdadırlar. Bu radikal azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$), hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (Altınışık, 2000).

2.2. Serbest Radikallerin Etkileri ve Oksidatif Stres

Biyolojik özelliklere sahip olan serbest radikaller oldukça dayanıksız reaktif molekül yapılarıdır. Serbest radikallerde bulunan ortaklanmamış elektronlar hücrelerdeki başka yapılarla etkileşime girerek oksidatif stres (hasar) oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikaller normal hücre ortamında oluşabildiği gibi bazı dış etkenlere bağlı olarak da meydana gelebilir (Şekil 2.1). Oksidatif stres organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması sonucunda meydana gelmektedir. Bu hasarlar lipidler, proteinler, nükleik asit gibi temel hücresel yapıları zarar verebilmektedir. Bu hasarlar sonucunda başta kanser, ateroskleroz, amiloidoz, bağışıklık zayıflığı, demens, hipertansiyon ve erken yaşlanma gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Kopani ve ark., 2006).



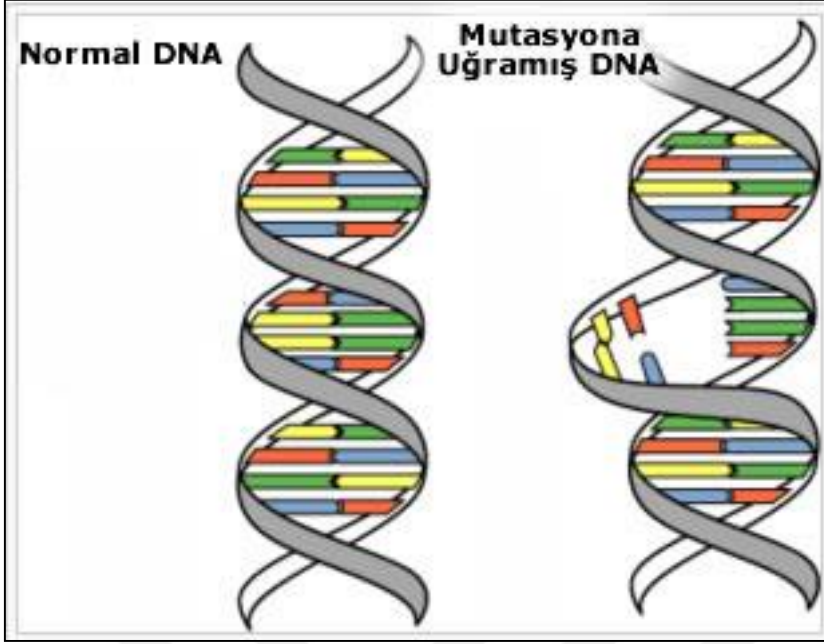
Şekil 2.1. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar.

2.2.1. Serbest radikallerin DNA hasarı üzerine etkileri

DNA (Deoksiribonükleik asit) yapısı birbirine zıt iki polinükleotit zincirlerden oluşan ve tek eksen boyu dönebilen heliks yapıya sahiptir. Heliks yapısının dışında bulunan deoksiriboz şekerleri birbirine bağlayan fosfat gurupları bulunmaktadır. Nükleotitler ise yapının iç kısmında yer alan ve şekerlerle bağ yapabilme özelliğine sahiptirler. DNA iki pürin (adenin ve guanin) ve iki pirimidin (timin, sitozin) olmak üzere toplam dört baz içermektedir (Todd ve ark., 1953).

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde, endojen veya ekzojen faktörlerin etkisi sayesinde meydana gelen değişimlerin tümü DNA hasarı olarak adlandırılır. DNA sürekli olarak dıştan gelen tehditlerin etkisi altında kalabilir. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi hücresel olaylar karşısında endojen olarak DNA yapısında sürekli olarak değişimler meydana gelmektedir (Kulaksız ve ark., 2007).

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlarından dolayı kararsız durumdadırlar. Kararlı duruma geçebilmek için DNA, protein, lipit gibi yapılara saldırdıkları ve aynı zamanda bu yapılara ciddi zarar verdikleri bilinmektedir. Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar (şekil 2.2). Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) deoksiriboz ve bazlarla çok kolay bir şekilde reaksiyona girerek ciddi değişikliklere sebep olurlar. Bir ROT olan H_2O_2 membranlardan çok kolay bir şekilde geçerek hücre çekirdeğine ulaşır. DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücrenin ölümüne bile sebep olabilir.



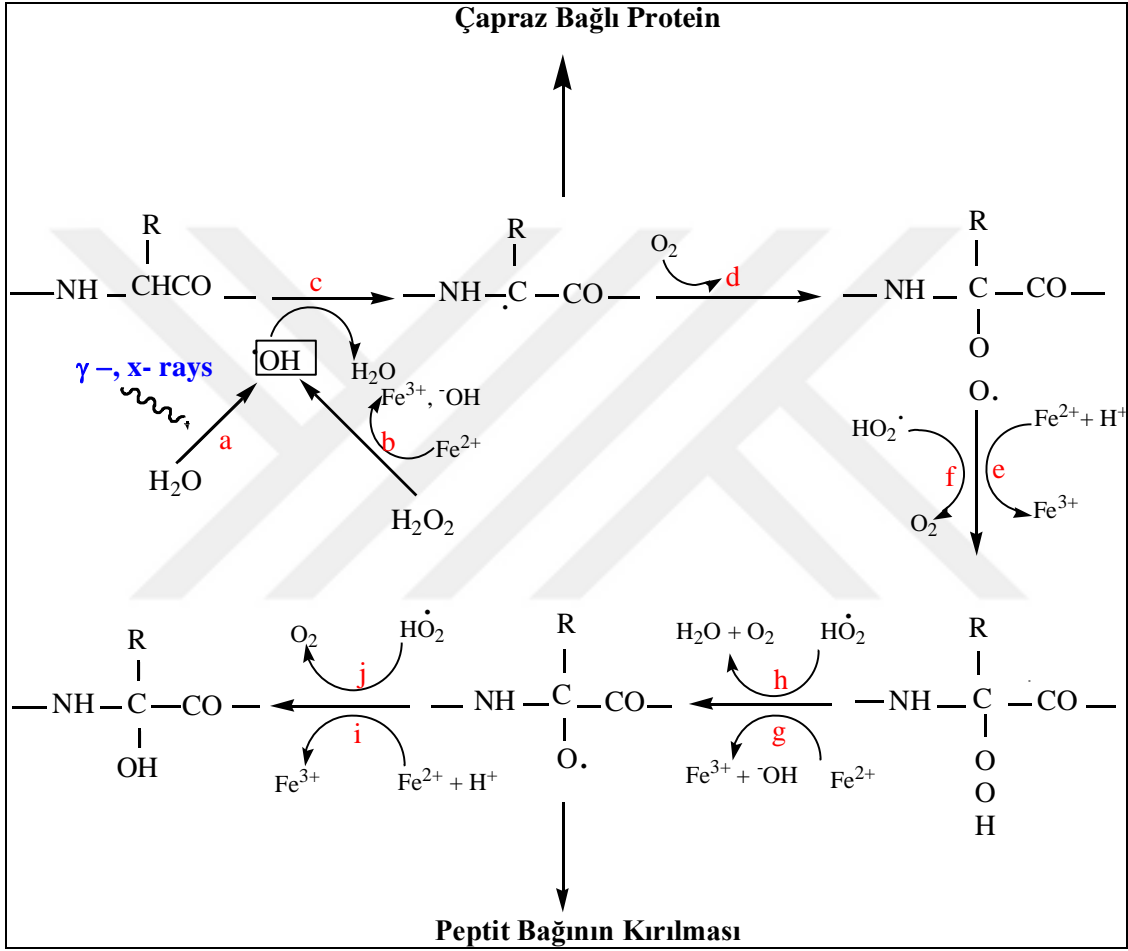
Şekil 2.2. Mutasyona uğramış DNA yapısı (Anonim, 2008).

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerir, fosfat çeşitli kasyonları bağlama yeteneğine sahip bir anyondur. $Fe^{+2/+3}$ ve $Cu^{+1/+2}$ iyonları negatif yüklü DNA'da sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif geçiş metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 'in DNA üzerinde reaksiyona girmesiyle oluşan hidroksil radikalleri ($\cdot OH$), hidroksil radikal söndürücüleri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Aynı zamanda hidroksi radikalilerin oluşturdukları ürünler de DNA yapısına çok ciddi bir şekilde zarar vermektedirler (Halliwell, 1999).

2.2.2. Serbest radikallerin protein oksidasyonu üzerine etkisi

Protein oksidasyonu, ROT ($\cdot OH$, H_2O_2 gibi) ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar, 2007). Proteinlerin reaktif oksijen türleri ya da oksidatif stres ürünleri ile girmiş oldukları etkileşimlerle meydana çıkmaktadır (Shacter, 2000). Bu etkiler yapılarındaki aminoasit komplekslerine bağlıdır. Daha çok etkilenen aminoasitler kükürt içeren, doymamış bağ içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi aminoasitlerdir. Protein hasarı ROT'un

aminoasitlerin α -karbonundan bir H^+ atomu bir hidroksi radikaline bağlanarak ($\cdot OH$) ayrılması ve H_2O 'nun oluşması (Şekil 2.3) ile başlar (Stadtman ve ark., 2003). Protein oksidasyonu sonucunda, protein agregasyonu, enzim aktivitesinde düşüş, inhibitörü ile aktivitenin kaybı, gen transkripsiyonunda değişim, immünojen aktifitelelerinde artış v.b. durumlar söz konusu olabilir (Shacter, 2000).



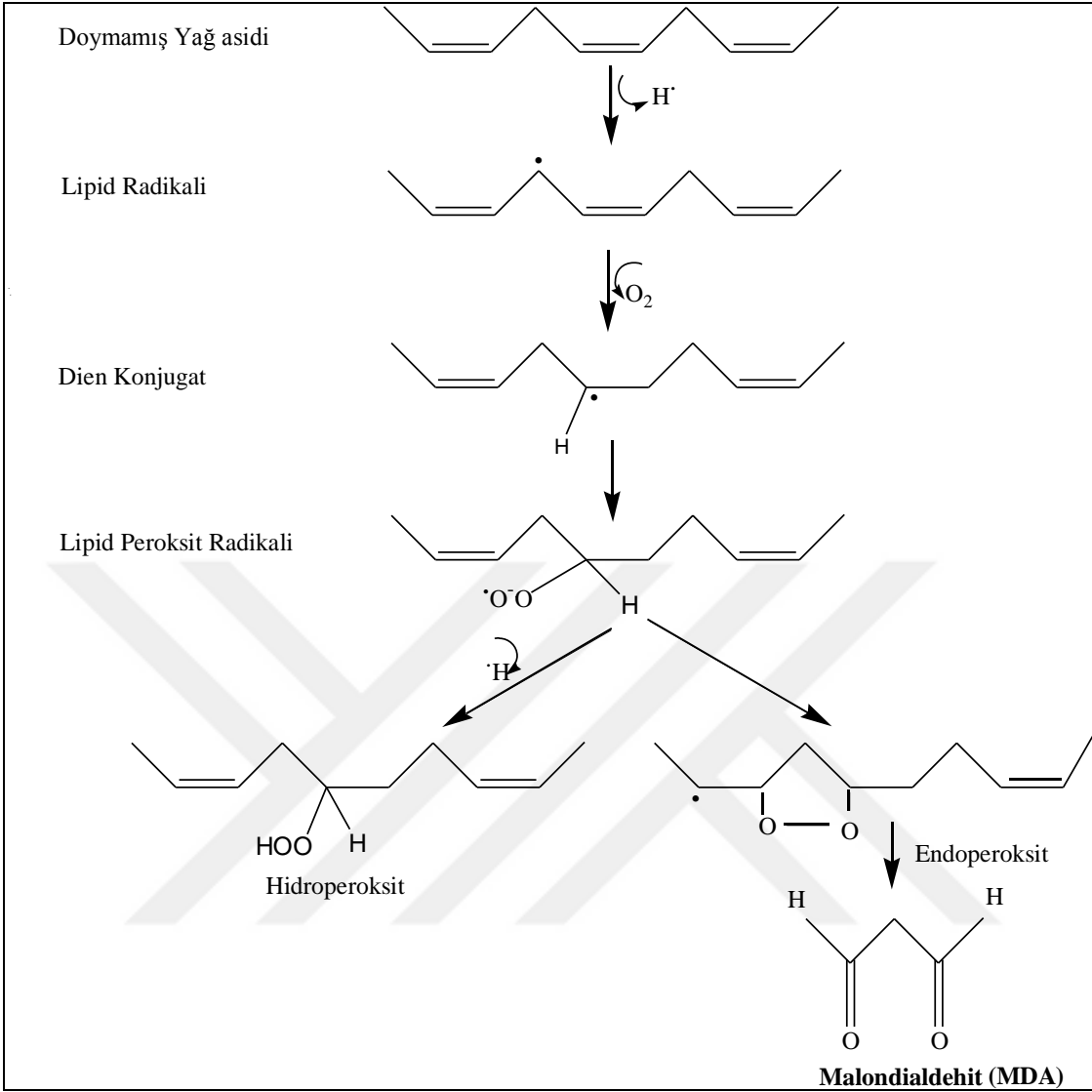
Şekil 2.3. Protein oksidasyonunun oluşumu.

Proteinlerin oksidasyonu, aromatik amino asit yapılarının nitratlaşmasına, tiyol gruplarının oksidasyonuna, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşmasına ve bazı amino asit yapılarının karbonil türevlerine dönüşümüne yol açar. Oksidasyon aynı zamanda polipeptit zincirinin yarılmasına ve çapraz bağlı protein agregatlarının oluşumuna yol açabilir. Bunun yanı sıra, proteinlerdeki fonksiyonel gruplar poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri ve glikasyon/glikooksidaz iyon reaksiyonları sonucu oluşan karbonhidrat türevler ile reaksiyona girerek inaktif türevleri oluştururlar.

Proteinlerin konformasyonel değişimi; agregasyon ve parçalanmadaki artışın yanı sıra sekonder ve tersiyer yapının bozulmasında da artışa yol açarak proteinlerin proteolize yatkınlığına ve normal fonksiyonlarında azalmaya yol açar (Refik ve ark., 2004).

2.2.3. Serbest radikallerin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi

ROT'un neden olduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, oksidatif bozunma ve membran lipidlerinin bozunmasından sorumludur. Aynı zamanda hücre hasarına ve birçok toksik maddelerin oluşmasına neden olmaktadır. Lipid peroksit olayı genellikle başlama, yayılma ve sonlanma olmak üzere üç bölümden oluşan bir zincir reaksiyondur. Çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikal yapıları karşısında çok güçsüzdürler. ROT'ların lipid yapılarına zarar vermeleri lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu durum karşısında lipidlerin akışkanlığı ve aynı zamanda geçirgenlikleri de azalmaktadır. Lipid peroksidasyonu bir radikalın metilen üzerinde bulunan bir H⁺ yerinde ayırması ile başlayan bir olaydır. Burada doymamış yağ asitlerine bu olay çift bağa yakın metil guruplarında daha iyi görülebilmektedir. Bu molekül yapısında yeni bir yapılanma gerçekleşmeye başlar. Bura da oksijen yeni bir peroksit oluşturmak üzere radikale eklenir. Bunun sonucunda lipit molekülünden bir H⁺ molekülü çıkartılır ve lipit hidroperoksit oluşmuş olur. Bunların akabinde bir zincir reaksiyon oluşmaya başlar. Bu peroksit yapıları yeniden düzenlenerek, ileri oksidasyonu ile malondialdehit (MDA) oluşabilir (Sinclair ve ark., 1990).

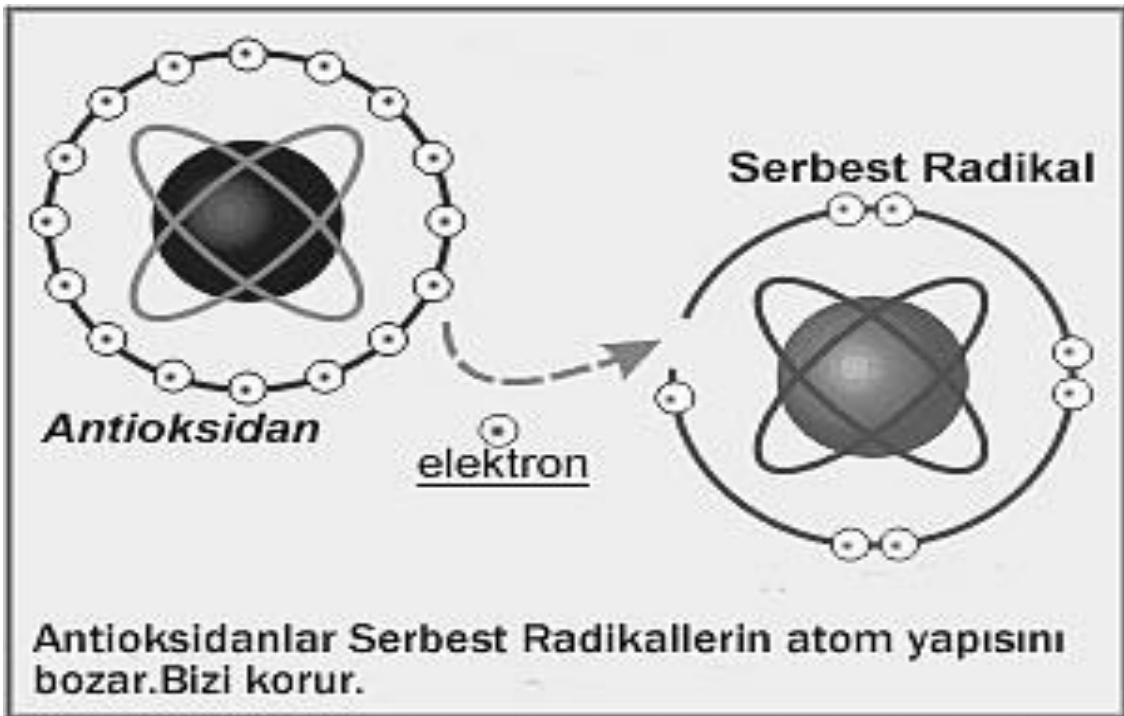


Şekil 2.4. Lipit Peroksidasyon sonucunda malondialdehitin oluşması.

2.3. Serbest Radikallere Karşı Antioksidanlar Etkisi

Oksijen yaşam için vazgeçilmez maddelerin başında gelmektedir. Hücreler genel ihtiyaçları olan oksijenleri kullandıkları zaman mitokondri oksijenli solunumda ATP (adenozin trifosfat) oluşumu sırasında serbest oksijen radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu üretilenler genel olarak serbest oksijen radikalleridir. Bu radikaller hücre için zararlı olabileceği gibi bazı faydaları da vardır. Bu hassas denge yaşam için hayati öneme sahiptir. Orta ya da düşük düzeydeki düzeyde ROT'leri hem hüresel yanıtlar artırır hem de bağışıklık sisteminin güçlenmesine katkı sağlar. Yüksek düzeyde ROT konsantrasyonu ise oksidatif stresin artmasına ve hücrenin zarar görmesine sebep olur

(Genestra, 2007). Oksidant ve antioksidan dengesinin bozulması durumunda kanser başta olmak üzere bir çok hastalık gelişebilir (Gupta ve ark., 2012). İnsan vücudu bu ROT'lara karşı kendi savunma mekanizması çerçevesinde kendi içerisinde oluşturduğu ya da dışarıdan aldığı antioksidanlar (serbest radikal söndürücüler) sayesinde immün bir defans sağlayarak başta kanser olmak üzere meydana gelebilecek bir çok hastalığı minimize edebilir. Antioksidanların yapılarında serbest radikallerin aksine fazla elektron bulundururlar ve serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için bu elektronlarını serbest radikallere aktarırlar(Şekil 2.5)(Valko ve ark., 2006).

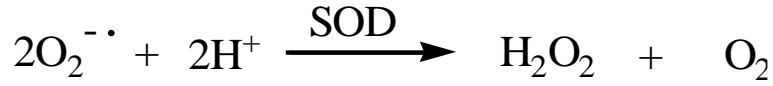


Şekil 2.5. Fazla elektrona sahip olan antioksidanların kararsız yapıdaki serbest radikallere elektron vererek radikalleri etkisiz hale getirmesi (Anonim, 2016)

2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması

2.3.1.1. Enzimatik antioksidanlar

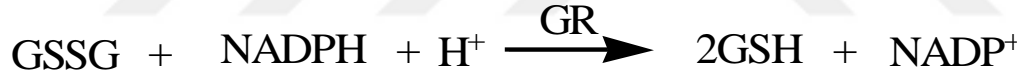
a-) Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonları katalizler (McCord ve ark., 1969).



b-) Glutasyon peroksidaz (GPx): GPx, genellikle dokuları oksidatif hasara karşı koruyan çok önemli enzimlerden biridir. Hidrojen peroksit varlığında glutasyon redüktaz (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşürken, hidrojen peroksit ise su moleküllerine dönüşmektedir (Burk ve ark., 1978).



c-) Glutasyon redüktaz (GR): GPx enzimi sayesinde H_2O_2 'nin indirgenmesi sonucunda glutasyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşmektedir. Bu yükseltgenmiş halin tekrar indirgenmiş hal olan GSH'a dönüşmesi gerekmektedir. Bu olay NADPH varlığında glutasyon disülfiti (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona çevirmektedir (GSH) (Carlberg ve Mannervik., 1981).



d-) Glutasyon-S-transferaz (GST): GST'lar lipid hidroperoksitlerine karşı Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar (Akkuş, 1995).

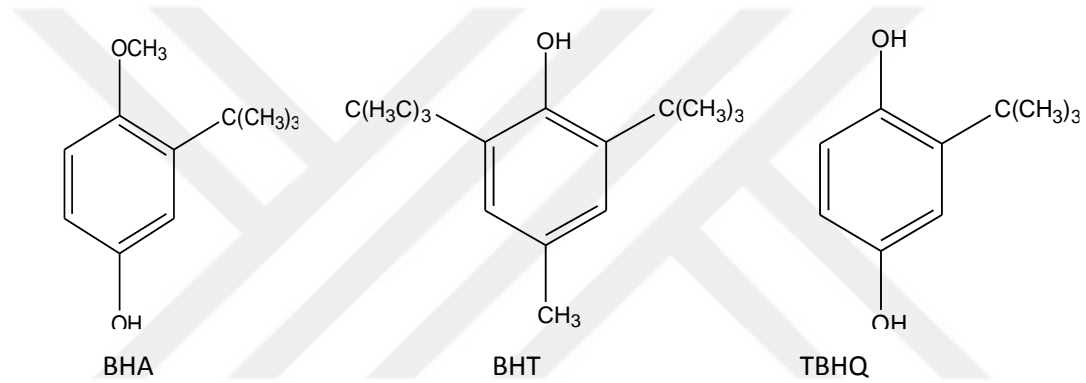


e-) Katalaz: Genel olarak katalazlar peroksizomlarda lokalize olmuş yapılarında 4 "hem" grubu bulunduran homoproteinlerdir. Katalaz, hidrojen peroksiti, su ve moleküler oksijene parçalar (Ardağ, 2005).



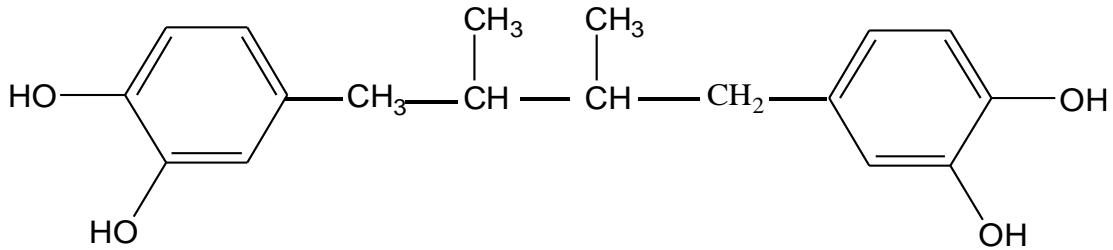
2.3.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

a-) Sentetik Antioksidanlar: Birçok besin maddelerinin bazı değerlerinin korunması için (renk, tat ve vitamin v.b.) bazı antioksidanların ilavesi gerekmektedir. Bunlara doğal antioksidanlar ilave edildiği gibi endüstride daha çok sentetik aminoasitler tercih edilmektedir. Gıdalarda en fazla kullanılan aminoasit sentetik aminoasitlerdir. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), propil galat (PG) ve tersiyer bütül hidro kinon (TBHQ), nordihidroguareyetik asit (NDGA) kullanılan sentetik antioksidanlardır.



Şekil 2.6. BHA, BHT ve TBHQ antioksidanlarının yapıları

Fenolik sentetik antioksidanlardan olan BHA ve BHT gıdalarda en çok tercih edilen ve sıcaklıklara karşı oldukça dayanıklı yapıya sahiptir. TBHQ da sıcaklığa karşı oldukça dayanıklı bir sentetik aminoasittir, genellikle kızartma gibi uygulamalarda kullanılır. NDGA ise toksik özelliği oldukça fazladır ve yağdaki çözünürlüğüde çok azdır (Arcan, 2005).

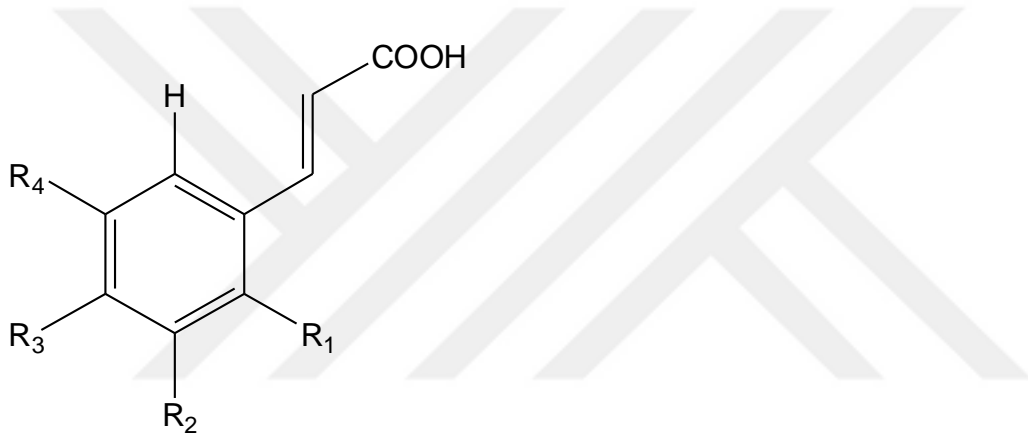


Şekil 2.7. NDGA (Nordihidroguareyetik asit)'ın yapısı.

b-) Doğal antioksidanlar:

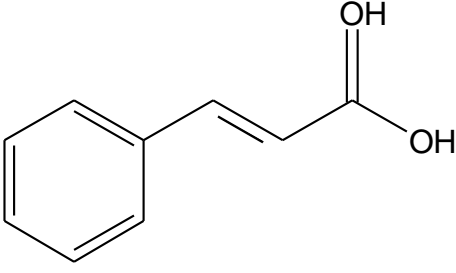
Fenolik asitler: Fenolik asitleri iki ana başlık altında sınıflandırılır. 1-hidroksibenzoik asit 2-) Hidroksisinnamik asit (Cadenas ve ark., 2002). Hidroksi benzoik asitler C₆ – C₁ fenol metan yapısında olup bitkisel maddelerde genel olarak iz miktarda bulunur.

Hidroksibenzoik asit, yapılarında hidroksi ve metoksi gurupları bulunduran yapılarıdır (Saldamlı, 2007). Bu gurupların sayısı ve dizilişlerine göre de yapılarında farklılık görülebilmektedir. Örnek olarak; salisilik asit, m- hidroksibenzoik asit gallik asit ve vanilik asit verilebilir (Rice-Evans ve ark., 1996).



Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitin yapısı.

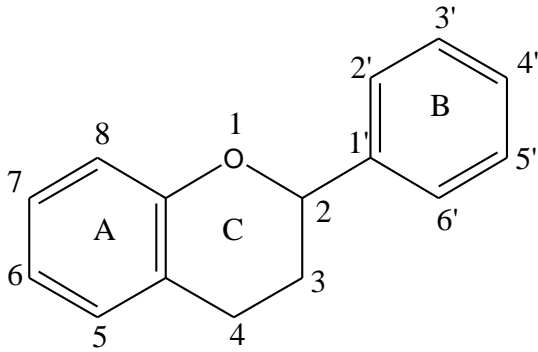
Hidroksisinnamik asitler, C₆-C₃ fenil-propanoid türevleridirler. Fenil propan halkasına bağlanan OH grubunun konumuna ve yapısına göre farklılıklar gösterir. Genel olarak bitkisel ürünlerde oldukça fazla bulunmaktadırlar. Örnek olarak, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitler verilebilir (Balasundram ve ark., 2006). Hidroksisinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenilalaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar (Heller ve ark., 1993).



Şekil 2.9. Hidroksisinnamik asit.

Flavonoidler: Bitki fenollerinin içerisinde en geniş yer kaplayan flavonoidlerdir. Yapı olarak difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahiptirler (Cadenas ve ark., 2002).

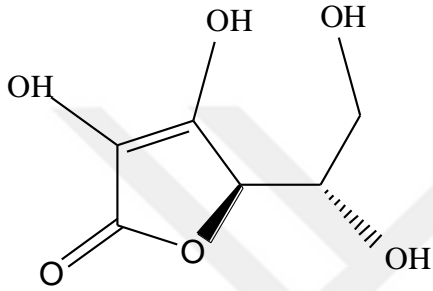
Doğada oldukça fazla bulunan, özellikle bitkilerin yapraklarında, çiçek ve köklerinde bulunur ve 4000 in üzerinde farklı flavonoid türü olduğu bilinmektedir. Flavonoidler en önemli antioksidanlardan olup düşük molekül sayısına sahip aromatik halka yapılı antioksidanlardır. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grubu içerirler. Metal şelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, konumu ve sayısına göre farklı radikal söndürme ve şelatlama aktivitesine sahiptirler (Heim ve ark., 2002).



Şekil 2.10. Flavonoidlerin genel yapısı.

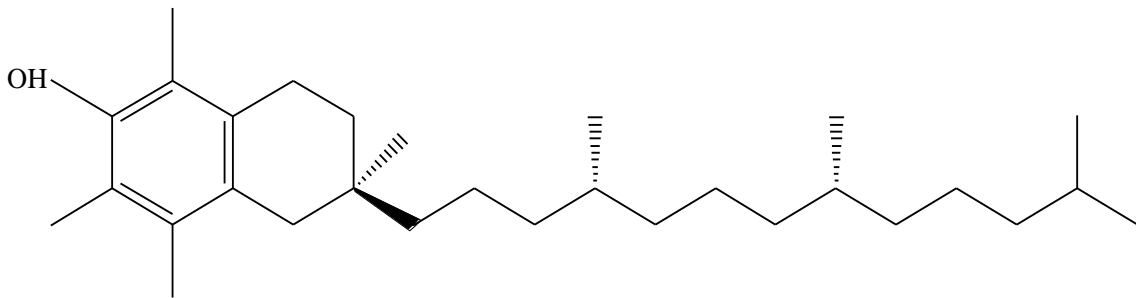
Askorbik Asit (Vitamin C): Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda çözünebilir ve bitkilerde özellikle meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunan bir vitamindir. Aynı zamanda serbest radikallere karşı güçlü söndürücü özelliğine sahip olduğu bilinir. Sulu çözeltilerde, askorbik asit ayrıca reaktif nitrojen oksit türlerini etkili

bir şekilde söndürücü özelliğine sahip antioksidanlardandır. Besindeki askorbik asidin temel kaynakları özellikle narenciye, kivi, kiraz, karpuz gibi meyveler ve domates, yeşil yapraklar, brokoli, karnabahar ve lahana gibi sebzelerdir (Güçlü ve ark., 2005). Hayvanlar L-Gulonoksidaz enzimi sayesinde C vitamini sentezini yapabilirken insanlarda bu enzim bulunmadığından C vitamini sentezi söz konusu değildir. İnsanlar günlük gerekli olan C vitaminini dışarıdan temin etmek zorundadırlar. C vitamini vücutta Fe emilimini yaparken, hidroksilasyon reaksiyonlarında da görev almaktadır (Heves, 2008).



Şekil 2.11. Askorbik asit (C vitamini).

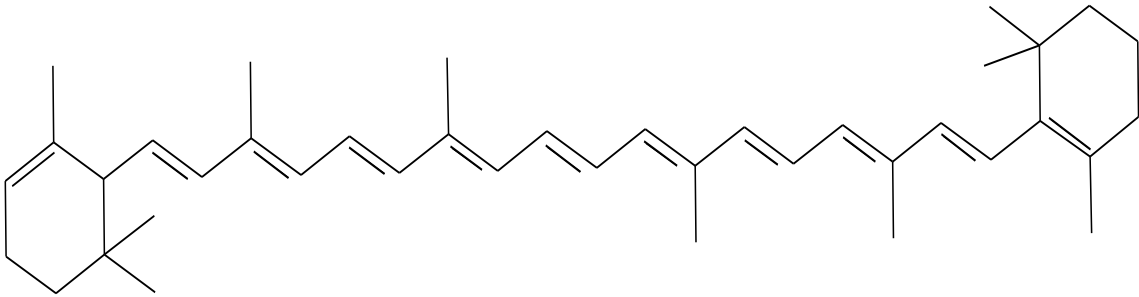
E Vitamini (α -tokoferol): Doğada 8 farklı izomere sahip olan tokoferoller α -, β -, γ - vb. tokoferoller diye de adlandırılırlar. Bunların kimyasal yapıları birbirine çok benzemesine rağmen içerisinde biyolojik olarak etkisi en fazla olan α - tokoferoldur. Tokoferoller de güçlü antioksidan özelliğe sahiptirler ve bu etkilerini de 6. karbonuna bağlı olan OH ile göstermektedir. E vitamininin hücre zarında lipit peroksidasyonunu kısmen engellediği, A vitamininin ve doymamış yağ asitlerinde yükseltgenmesinde görev aldığı belirtilmiştir (Tekman ve ark., 1998).



Şekil 2.12. Takoferollerin genel yapısı.

Tokoferoller neredeyse tüm tahıl tohumlarında, kuru yemişlerinde, sebzelerin ve meyvelerin yağlarında ciddi anlamda bulunabilirler. α -Tokoferol hücre organelleri ve hücrenin dış membranında bulunan yağda çözünebilen bir vitamindir. α -Tokoferol zincir kırıcı özelliğine sahip oldukları ve aşırı derecede oksidasyonlardan membranları koruduğu bilinmektedir (Godbout ve ark., 2004).

β -Karoten: Karotenler fotosentez için çok önemli yapılardır. Işığı soğutulup klorofile aktararak fotosentezin oluşmasına ciddi katkı sağlar. Bitki ve meyvelerde bol miktarda bulunan kırmızı-turuncu renkli pigmentlerdir. Karotenler terpen yapısında olup sekiz izopren biriminden biyokimyasal olarak sentezlenebilirler. β -Karoten ince bağırsak mukozasında β -Karoten dioksidadz enzimi varlığında yıkılarak A vitaminine (retinol) dönüşürler. β -Karoten karaciğerde depolanabildiği için gerektiğinde A vitaminine dönüşebilmektedir. Bu anlamda provitamin olarak da sayılabilmektedir. β -Karoten biyolojik sistemlerde yağlarda çözüdüğünden dolayı özellikle lipid peroksidasyonunu önleyen ve serbest radikalleri yok etmesinden dolayı hücre zarını koruyan önemli bir antioksidandır (Singh ve ark., 2006).



Şekil 2.13. β -Karoten genel yapısı.

2.4. Badem Meyvesinin Botanik Özelliği, Yayılışı ve Kullanım Alanları

Badem (*Prunus Dulcis*), gülgiller familyasından ve Anayurdu Asya'nın Güneybatısı olan bir ağaç ve bu ağacın tohumları olarak tanımlanabilir (Küden ve ark., 2014). Badem ilk olarak İran, Türkiye, Suriye ve Filistin'de yetiştirilmiş, buralardan da Yunanistan, Kuzey Afrika, İtalya ve İspanya'ya, sonraki dönemlerde ise Kuzey Amerika'ya getirilmiş ve bilhassa Kaliforniya'da 1940 yılından sonra badem

yetiştiriciliğinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Badem ağaçları Kuzey yarımkürede 30-44 enlem derecelerinde, güney yarımkürede 20-40 enlem derecelerinde yetiştirilmektedir (Özsoy, 2003).

Esas itibariyle sıcak iklim meyvesi olan badem, meyvelerinin olgunlaşması için yüksek sıcaklıklara gereksinim duyması nedeniyle Anadolu'nun çok yüksek yaylalarında yetiştirilememektedir. Karadeniz bölgesinin serin ve nem oranı nispeten yüksek kesimleri de badem için uygun değildir. Kış dinlenme ihtiyacı düşük olan bademin yetiştiriciliğini kısıtlayan temel faktör ilkbahar geç donlarıdır. Bu nedenle, ilkbahar geç donlarının yaşandığı bölgelerde geç çiçek açan badem çeşitlerinin yetiştirilmesi büyük önem arz eder (Özsoy, 2003).

Badem Türkiye'de Karadeniz bölgesi hariç hemen hemen her yerde doğal olarak yetişen ya da kültür olarak yetiştirilebilen meyvelerendir. En çok yetiştirilen bölgelerin başında Güneydoğu, Akdeniz ve Ege bölgeleri gelir. Bu bölgelerden Güneydoğu Anadolu bölgesinde başta Mardin ve Diyarbakır illeri olmak üzere neredeyse tüm illerde yetiştirilmektedir (Dokuzoğuz ve Gülcan., 1973).

Bademler genel olarak; acı bademler ve tatlı bademler olmak üzere iki gruba ayrılır. Acı bademler siyanidik asit içerdiklerinden zehirlidir ve yenilmesi sakıncalıdır. Acı bademler badem yağı çıkarmak için kullanılır. Tatlı bademlerde acılığı veren siyanidik asit ya hiç yoktur veya çok az bulunur.

Tatlı bademler kabuğun kırılma durumuna göre dört gruba ayrılır:

- 1- El bademleri: Çok ince kabuklu bademlerdir. Randımanı yaklaşık % 70'e varır.
- 2- Diş bademleri: Bu grup bademler dişle kolaylıkla kırılabilir. Randımanları % 50'ye varır.
- 3- Sert kabuklu bademler: Dişle çok zor kırılır. Randımanı % 40'a kadar varabilir.
- 4- Taş bademleri: Kabukları çok kalın olduğundan iç randımanı düşüktür (% 18-30).

Bademler, çalı veya 10 metreye kadar boylanabilen ağaçlar oluştururlar. Dikine veya yayvan büyürler. Gövdeleri gri-parlak kırmızımsı kahverengidir. Dallar, grimsi kahverengi, sık dalcıklıdır. Gözler, odun ve meyve gözleri olarak gruplandırılır. Yapraklar, uzun, ok biçiminde, parlak koyu yeşil renklidir. Çiçekler, Rosaceae'lerin tipik sayısında olup, beş çanak, beş taç yaprağı, yirmi erkek organ ve bir dişi organ içerir. Taç yaprakları pembe kırmızı renkte olup, üzerleri koyu yeşil damarlıdır.

Yumurtalık içerisinde iki tane tohum taslağı bulunur. Genellikle bunlardan yalnız birisi gelişir, ancak ikisi de geliştiğinde çift badem meydana gelir. Bazı çeşitlerde ise, iki yumurtalığın gelişmesi sonucu ikiz badem oluşur. Bunların ticari değeri yoktur (Özsoy, 2003).

Badem meyvesi, botanik olarak şeftali ve kayısı gibi bir sert çekirdekli meyvedir. Ancak, olgun bademin içi yendiğinden sert kabuklu meyveler grubunda da yer almaktadır. Bademlerde kromozom sayısı $n=8$ 'dir. Tozlanma arılarla olur. Bademler, genellikle birkaç çeşit dışında kendiyle uyuşmaz ve ayrıca, çeşitler arasında karşılıklı uyuşmazlık durumu da görülebilir. Bu nedenle badem plantasyonları en az iki çeşitle kurulmalıdır (Küden, A.B ve Küden, A., 2014). Badem ağacı toprak bakımından hiç seçici değildir. Başka meyve ağaçlarının iyi yetişemeyeceği kurak, taşlı, çakıllı ve kireçli topraklarda çok iyi büyür. Ancak, toprağın derin olmasını ister. Bu gibi yerlerde kökler dört metre kadar derine gidebilir. Ancak badem, kumlu tınlı topraklarda en iyi sonucu verir. Badem, topraktaki aşırı nemden ve taban suyunun oynaklığından hoşlanmaz. Kumlu, çakıllı, kuru topraklar organik maddelerce desteklenmelidir. Badem ağacı da en az şeftali ağacı kadar azota gereksinim duyar. Besin elementleri noksanlığı bulunan topraklarda ağaçlar iyi gelişemez, meyve tutumu düşük olur ve içte iyice oluşamayarak, kabuğunu doldurmayıp buruşuk hal alır.

Diyarbakır ilçesinde çok farklı badem türü yetiştirilmektedir. Yetiştirilen badem genotip sağlamlık oranı % 100 ve iç doluluk oranı çok iyi olarak görülmektedir. Çiçeklenme oranının çok iyi aynı zamanda kalite oranının da gayet iyi olduğu saptanmıştır (Mikdat ve ark., 2010).



Şekil 2.14. Badem (*A.trichamygdalus*) meyvesi.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Amygdalus trichamygdalus* (Hand.- Mazz) Woronow var. *trichamygdalus* Rosaceae c.v. meyvesi Diyarbakır - Eğil ilçesinde yetiştirilen tatlı kültür bademlerinden olup tür teşhisi Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Fazlı ÖZTÜRK tarafından yapılmıştır.

Kullanılan kimyasal maddelerin adı ve markası (çizelge 3.1) ve kullanılan cihazlar ve markaları (çizelge 3.2) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.

Malzeme	Marka
Agaroz	Sigma
Bovin Serum Albumin	Sigma
1, 1- difenil-2-pikril hidrazin (DPPH)	Sigma
Glasiyel asetik asit	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
Bromofenol blue	Sigma
Gallik Asit (3, 4, 5- trihidroksibenzoik asit)	Sigma
Glisin	Sigma
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma
Deoksiriboz	Sigma
Trikloroasetik asit (TCA)	Merck
Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA)	Sigma
Potasyum asetat (CH ₃ COOK)	Merck
Folin ciocalteu's fenol reaktifi	Merck
Askorbik asit	Merck
β-merkaptto etanol	Fluka
Bütillenmiş hidroksi anisol (BHT)	Merck
Alüminyum nitrat Al(NO ₃) ₃	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler (Devam).

Ferrozin	Fluka
2-tiyobarbütirik asit (TBA)	Fluka
Etil asetat	Carlo-Erba
Quercetin dihidrat	Fluka
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Fluka
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Fluka
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Carlo-Erba
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetra astik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich

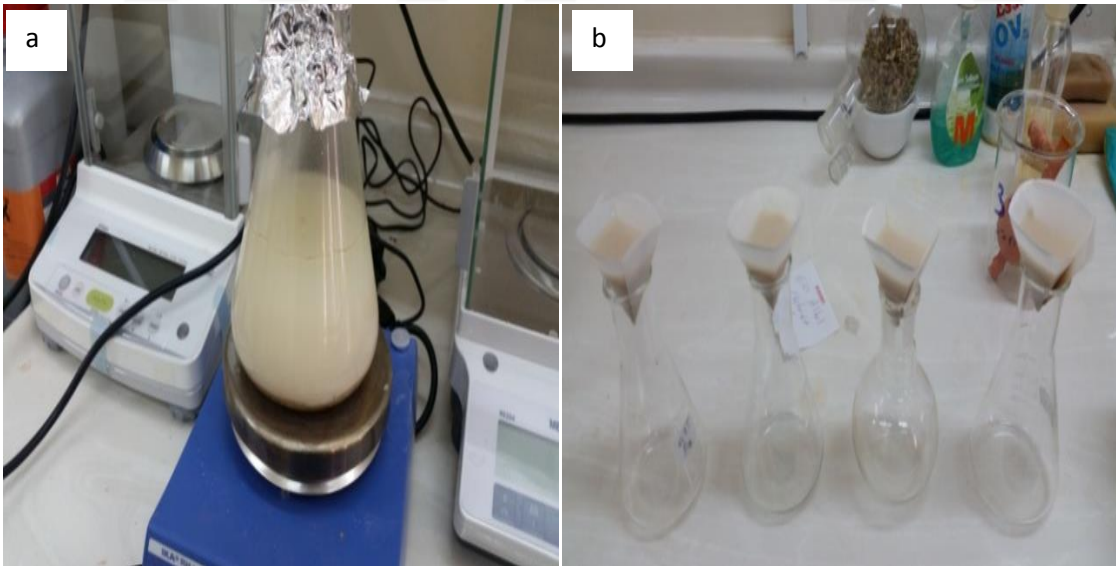
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Cary 100 Bio model UV-VIS Spektrofotometre	Varian
RE-100B model Evaporatör	Bibby Strilin
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio Rad Gel Doc XR
Terazi	Metler Toledo
Elektroforez	Bio Rad mini protean
Derin dondurucu	Sanyo marka
Sterilizatör	Heraus
Mikrodalga fırın	Arçelik
Otoklav	Hiramaya
Laborota 4000 model, Soxhlet	Heidolph
Universal 320 R model, Santrifüj	Hettich
Buzdolabı	Arçelik
pH -metre	Metler Toledo
Çalkalayıcı	Memmert
Mikropipet	Ependorf
Membran filtresi	Schleicher-Schvell
Vortex	Heidolph

3.2. Metot

3.2.1. Meyvenin etanol ekstraktının hazırlaması

Diyarbakır Eğil bölgesinden toplanan kuru badem (*A. trichamygdalus*) meyvesinden 250 g alınıp öğütücüye konuldu daha sonra öğütücüde toz haline gelene kadar öğütüldü. Öncelikli olarak öğütülen *A. trichamygdalus* bitkinin (badem) yağı ayrıldı. Bu işlemi yaparken öğütülmüş bitki, 500 ml'lik bir beher içerisine konup üzerine 300 ml'lik hekzan ilave edildikten sonra içerisine manyetik karıştırıcıda bir gün boyunca karıştırıldı (Şekil 3.2-a). Elde edilen çözeltiyi çökelekten ayırmak için süzgeç kağıdı kullanıldı (Şekil 3.2.-b). Daha sonra çözeltiden evaporatör yardımıyla, çözücüde mevcut olan yağ ayrıldı (Şekil 3.3.). Bu işlem aynı koşullar altında üç defa yapıldı. Daha sonra yağı ayrılmış olan çökelek üzerine yaklaşık 300 ml etil alkol ilave edilerek yine bir gün boyunca karıştırdı. Evaporatör yardımıyla etil alkol uzaklaştırıldı. Bu işlemde 3 defa tekrarlandı. Bu işlemler sonucunda 1.015 g ekstrakt elde edildi. Elde edilen ekstrakt +4 °C de bir kap içerisinde muhafaza edildi.



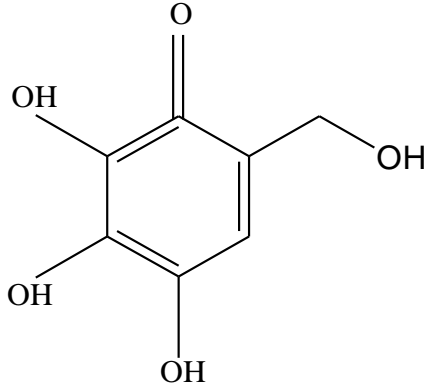
Şekil 3.1. Etanol ekstraktının hazırlanması (a) karıştırma işlemi, (b) süzme işlemi.



Şekil 3.2. Evaporatör ile yağ ayırma işlemi.

3.2.2. Toplam fenolik bileşen miktar tayini

Badem (*A. trichamygdalus*) ekstraktının toplam fenolik bileşik tayini Folin-Ciocalteus (Singleton ve ark., 1999) yöntemi ile belirlendi. Öncelikli olarak derişimi 0.5 mg/ml olan gallik asit çözeltisinden derişimi 50, 100, 250, 350 ve 500 μg /ml olan beş farklı konsantrasyonda etanol çözeltisi hazırlandı. Aynı şekilde bu çalışmada kullanılan *A. trichamygdalus* ekstraktının da 0.5 mg/ml olan derişiminden, çözeltisi beş farklı konsantrasyonda etanol çözeltisi içerisinde hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden hem gallik asit hemde *A. trichamygdalus* ekstraktından ayrı ayrı 40 μl alındı, üzerlerine 1160 μl saf su ilave edildi ve bunların üzerine 200 μl 2 N folin reaktifi ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika karıştırıldıktan sonra üzerlerine 600 μl % 20'lik Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilip iyice karışması için oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalandı. Bu işlem bittikten sonra UV' de 765 nm'de absorbans değerleri okundu.

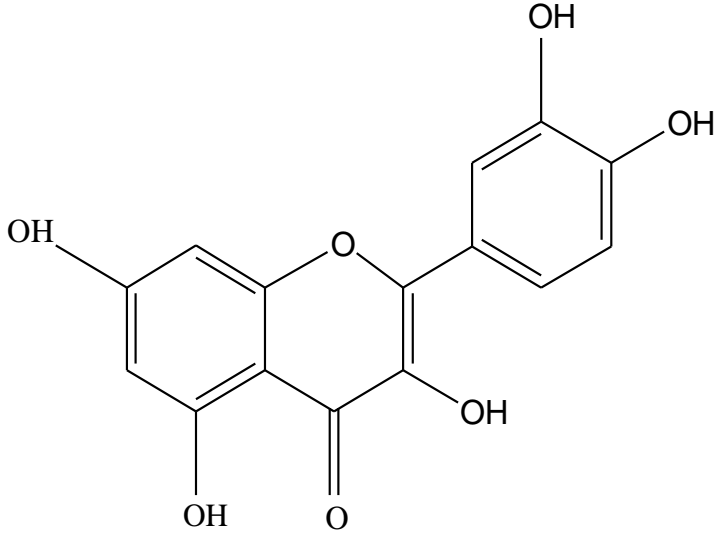


Şekil 3.3. Gallik asit.

3.2.3. Toplam flavonoid bileşen miktar tayini

A. trichamygdalus etanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen tayini daha önce bu yöntemi tayin eden (Zhishen ve ark., 1999) çalışmasından esinlenerek yapıldı. Standart olarak quercetin kullanıldı. Buradaki temel hedef quercetin artan konsantrasyonlarındaki flavonoid bileşen miktarından yararlanarak bu çalışmada kullanılan *A. trichamygdalus*'ın içerisindeki toplam flavonoid bileşen miktarını tayin etmektir.

Quercetin etanol içindeki 100 µg/ml'lik stok çözeltisinden 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. Çalışmanın konusu olan *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının da 0.5 µg/ml'lik çözeltisinde aynı zamanda hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler üzerine 0.1 ml % 10'luk $Al(NO_3)_3$, 0.1 ml 1M CH_3COOK ve 3.8 ml metanol ilave edildi. Bu işlemden sonra hazırlanmış olan tüplere quercetin çözeltisinden 1 ml quercetin tüpüne, 1 ml ekstrakt çözeltisinden de ekstraktın olduğu tüpe ilave ettikten sonra iyice karıştırıldı. Elde edilen bu karışımlar 25 °C'de 40 dakika su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Son olarak da bu işlem bittikten sonra UV' de 425 nm'de absorbansları okundu.



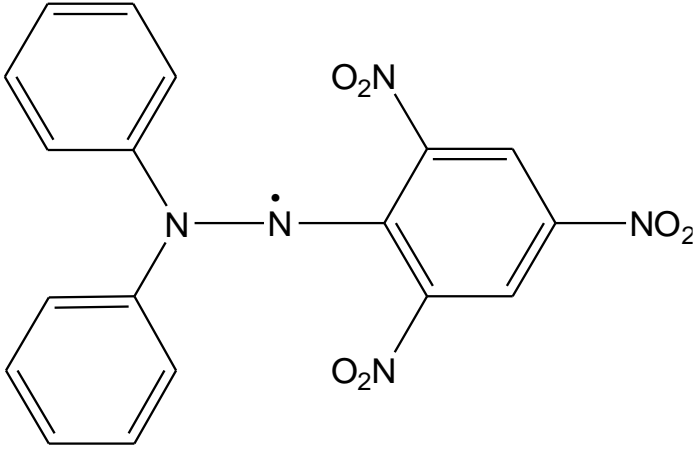
Şekil 3.4. Quercetin.

3.2.4. DPPH radikalini söndürme aktivitesi

Çalışma konusunun ekstraktı olan *A. trichamygdalus*'ın DPPH söndürme aktivitesi, daha önce bulunmuş olan yöntem (Blois, 1958) kullanılarak hesaplandı. Bu işlemde pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. Deney iki ayrı konsantrasyonda yapıldı. Farklı konsantrasyonda ekstraktın etkisini anlayabilmek için 1 mM DPPH ve 0.1 mM DPPH metanol çözeltisi kullanılarak deney yapıldı. 1 mg/ml BHA ve aynı oranda ekstrakt çözeltileri 4 ayrı tüplerde farklı konsantrasyonlarda 5, 10, 15 ve 20 µg/ml olarak hazırlandı. *A. trichamygdalus* etanol ekstraktı ve pozitif kontrol 3'er ml alınarak üzerlerine 1 mM DPPH çözeltisi ilave edildi. Bu işlem 0.1 mM DPPH çözeltisi içinde yapıldı. Tüpler içerisinde oluşan karışımlar 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyonaya bırakıldı. Bu süre sonunda 517 nm'de absorbans değerleri okundu.

Bu işlemlerin sonucu olarak artan DPPH etanol konsantrasyonuna karşın *A. trichamygdalus* etanol konsantrasyonunun grafiği elde edilmiştir. Bu grafik aşağıdaki eşitlik (3.1) kullanılarak elde edildi.

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$



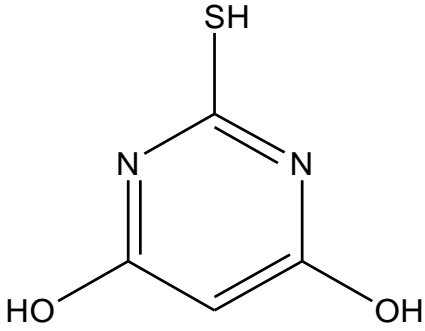
Şekil 3.5. DPPH'nin Yapısı.

3.2.5. Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi

A. trichamygdalus meyvesinin etanol ekstraktının lipit peroksidasyonu önleme aktivitesi tiyobarbitürik asit (TBA) metodu kullanılarak bulundu (Lo ve ark. 2005). Bu deneyde pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. BHA % 97' lik etanol çözeltisinde 30 mg/10 ml çözeltisi aynı şekilde bizim ekstraktımızda %70' lik etanol çözeltisi içerisinde 4 ayrı konsantrasyonlarda 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler üzerine önceden hazırlanmış olan karaciğer homojenatından 200 µl ve sırayla 200 µl ekstrak, 200 µl, FeCl₃, 200 µl EDTA, 200 µl H₂O₂, 200 µl askorbik asit sonrasında vortext ile iyice karıştırıldı. Daha sonra 37 °C'de 1.5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışımın üzerine 1200 ml % 28 lik TCA ilave edildi. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alındıktan sonra üzerine 1200 µl TBA ilave edildi ve 100 °C 10 dk bekletildikten sonra örnekler buz içerisinde alınarak UV'de 532 nm de absorbans değerleri okundu.

Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe (3.2) göre hesaplandı.

$$I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.2)$$



Şekil 3.6. Tiyobarbitürük asit (TBA).

3.2.6. Protein oksidasyonu önleme aktivitesi-SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

A. trichamygdalus etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme aktivitesi H_2O_2/Fe^{+3} /askorbik asit sisteminin Bovine Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getireceği zararları koruyucu özelliği araştırıldı. Çalışma dikey elektroforez yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Çalışmada *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktından ve BHA için ayrı ayrı 60 mg/ml'lik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 500, 1000, 1500 ve 2000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik 4 ayrı konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. Bu deneyde kullanılmak üzere hazırlanan BSA 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7.4) içinde çözüldü. Deney tüpüne sırasıyla 200 μl potasyum fosfat tamponu (pH=7.4) veya ekstrakt ve pozitif kontrolün konsantrasyona bağlı seyreltik çözeltileri, 200 μl BSA, 200 μl 1.0 mM $FeCl_3$, 200 μl 3.0 mM EDTA, 200 μl 2.5 mM H_2O_2 ve 200 μl 1.0 mM askorbik asit ilave edildi. Toplam hacmi 1.2 ml olacak şekilde karışım 37 °C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu işlemde sonar inkübe edilen reaksiyon karışımı Laemli's (1970) metodu kullanılarak % 10' luk sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) içinde elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Çalışılan örnekler tamponla (Tris HCl pH= 6.8, % 2 SDS, % 5 2-merkapt etanol, % 10 sükröz ve % 0.002 bromofenol blue) eşit hacimde karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 5 dakika 100 °C'de ısıtıldı. Bu süre sonunda her bir örnekten 10 μl

elektroforez kuyucuklarına yüklendi. Kuyucuklar 6 farklı şekilde ve konsantrasyonda hazırlandı (çizelge 3.3-3.4).

Çizelge 3.3. Protein oksidasyonunda elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları (Badem için)

Kuyucuklar	Reaksiyon Koşulları
1.Kuyucuk	BSA
2.Kuyucuk	BSA+Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc
3.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 500 µg/ml A.t.
4.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 1000 µg/ml A.t.
5.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 1500 µg/ml A.t.
6.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 2000 µg/ml A.t.

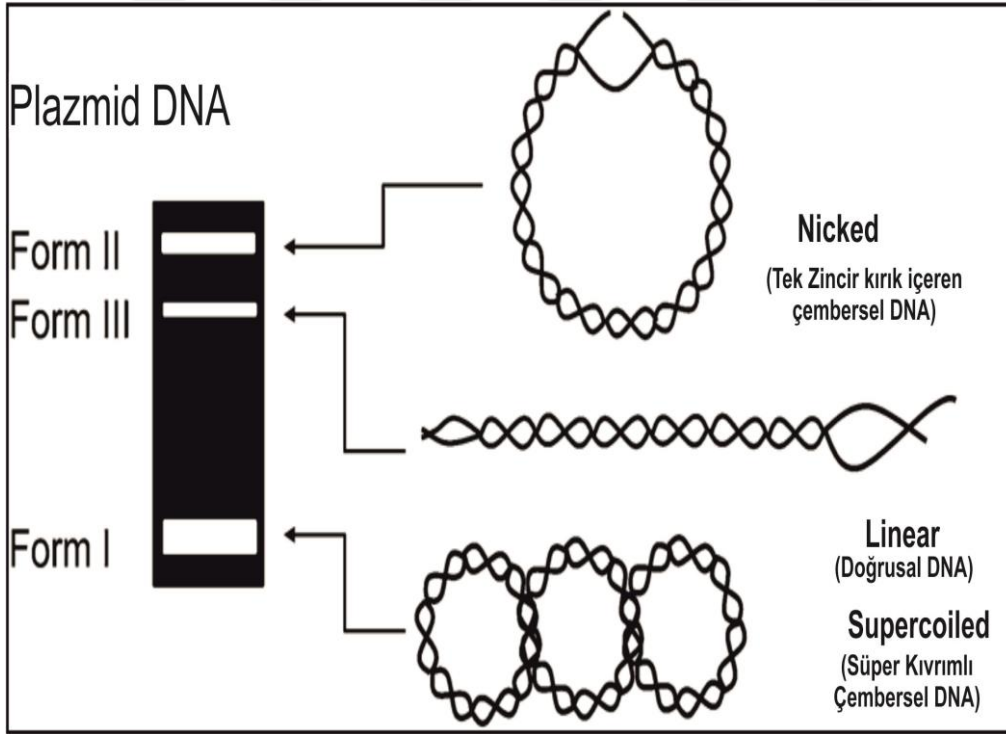
Çizelge 3.4. Protein oksidasyonunda elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları (BHA için)

Kuyucuklar	Reaksiyon Koşulları
1.Kuyucuk	BSA
2.Kuyucuk	BSA+Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc
3.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 500 µg/ml BHA
4.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 1000 µg/ml BHA
5.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 1500 µg/ml BHA
6.Kuyucuk	BSA+ Fe ³⁺ / H ₂ O ₂ /Asc + 2000 µg/ml BHA

Elektroforez cihazı Jel BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak minijel için 25 mAmp sabit bir değer ve maximum voltajda yürütücü tamponla (Tris HCl pH= 6.8, % 2 SDS, % 5 2-merkapt etanol, % 10 sükröz ve % 0.002 bromofenol blue) BioRad tankında yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jeller % 15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 2 saat boyunca renklendirildi. Renklendirme işleminden sonra boya çıkarma işlemi saf su, etil alkol yardımıyla jellerden çıkarıldı. Son olarak elde edilen jeller jel görüntüleme sistemiyle dijital olarak fotoğrafları çekilip görüntü net bir şekilde elde edildi.

3.2.7. DNA oksidasyonu önleme aktivitesi-agaroz jel elektroforezi

DNA'nın; süper kıvrımlı çembersel DNA (Form 1; DNA zincirinde herhangi bir kırık yok), tek bir kırık içeren çembersel DNA (Form 2; DNA zincirlerinden bir tanesinde kırık vardır), doğrusal DNA (form 3; çift sarmallı DNA zincirlerinde bir ya da birden fazla kırık vardır) olmak üzere üç formu vardır (Şekil 3.8). Bu formlar agaroz jel içerisinde farklı hızlarla hareket etmektedir. Form 1'de yoğunluk fazla hacim küçük olduğundan jelde en hızlı hareket eden formdur. Form 2'de yoğunluk form 1'e göre daha düşük olduğu için jelde biraz daha yavaş hareket eder. Form 3 ise hız olarak form-1 ve form-2 arasında bir hıza sahiptir (Boyer ve ark. 1993).



Şekil 3.7. DNA'nın formları ve kırıkların şekilsel olarak gösterimi.

Öncelikli olarak elektroforez için agaroz jel hazırlandı. 1 g agaroz ve 100 ml tris asetat tamponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) karıştırıldı. Daha sonra mikrodalga fırınında kaynatıldı ve 60 °C' ye soğutuldu. Bu işlemten sonra çözeltinin üzerine 1.5 µL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandı ile sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Son olarak da

jelin donması için oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bu işlem devam ederken hazırlanan DNA çözeltileri farklı konsantrasyonlardaki badem ekstratının olduğu ve olmadığı ependroflar içerisinde toplam konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Bu işlem iki ayrı çalışma şeklinde gerçekleştirildi. Bir çalışmada Cu^{2+} 'nin olduğu ve olmadığı diğer çalışmada H_2O_2 ve UV varlığında ya da yokluğunda DNA kesiminin nasıl etkilendiği tespit edilmeye çalışıldı. İlk deney için bazı ependroflarda herhangi bir işlem görmemiş DNA yalnızca UV uygulanmış ya da yalnızca H_2O_2 eklenmiş plazmit DNA kontrol olarak kullanılmıştır. Burada DNA kesimini görmek için jel elektroforezinde, 13 ayrı kuyucuk hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.5. DNA jel elektroforez kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları

Kuyucuklar	Reaksiyon Koşulları
1. Kuyucuk	DNA
2. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 ,
3. Kuyucuk	DNA + UV
4. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV
5. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (250 $\mu\text{g/ml}$) + UV
6. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)
7. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (100 $\mu\text{g/ml}$)
8. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (250 $\mu\text{g/ml}$)
9. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (350 $\mu\text{g/ml}$)
10. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (500 $\mu\text{g/ml}$)
11. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (750 $\mu\text{g/ml}$)
12. Kuyucuk	DNA + H_2O_2 + UV + <i>A.t</i> (1000 $\mu\text{g/ml}$)
13. Kuyucuk	DNA

İkinci deney için ise Cu^{+2} varlığında ya da yokluğunda DNA kesim etkileri analiz etmek için çalışılmıştır. Burada 16 ayrı kuyucuk oluşturulmuştur.

Çizelge 3.6. DNA jel elektroforez bakır varlığında veya yokluğunda kuyucuklar içerisindeki reaksiyon koşulları

Kuyucuklar	Reaksiyon Koşulları
1. Kuyucuk	DNA
2. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (50 µg/ml),
3. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (100 µg/ml)
4. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (250 µg/ml)
5. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (350 µg/ml)
6. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (500 µg/ml)
7. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (750 µg/ml)
8. Kuyucuk	DNA + <i>A.t</i> (1000 µg/ml)
9. Kuyucuk	DNA + CuCl_2
10. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (50 µg/ml)
11. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (100 µg/ml)
12. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (250 µg/ml)
13. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (350 µg/ml)
14. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (500 µg/ml)
15. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (750 µg/ml)
16. Kuyucuk	DNA + CuCl_2 + <i>A.t</i> (1000 µg/ml)

Jel kullanıma hazır hale geldikten sonra otoklav bandı açıldı ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan DNA karışımları uygun bir pipet ile kuyucuklara aktarıldı. Jel 200 mL tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 60 V'ta 500 mA akım uygulanarak 90 dakika süreyle yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra kapak çıkarıldı. Daha sonra jelin fotoğrafı jel görüntüleme sistemi ile çekildi. DNA zincir kesiminin % inhibisyonu (Fukuhara ve Miyata., 1998) hesaplandı.(3.3).

$$\%I = 1 - [(S_{m+a} - S_c) / (S_m - S_c)] \times 100 \quad (3.3)$$

Buradaki formülde; S_c =Kesilmemiş kontrol DNA'daki supercoiled formunun yüzdesi,

S_m =DNA'nın kesimini önleyen madde dışındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesi ve S_{m+a} =DNA'nın kesimini önlediği düşünülen maddenin varlığındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesidir.



4. BULGULAR

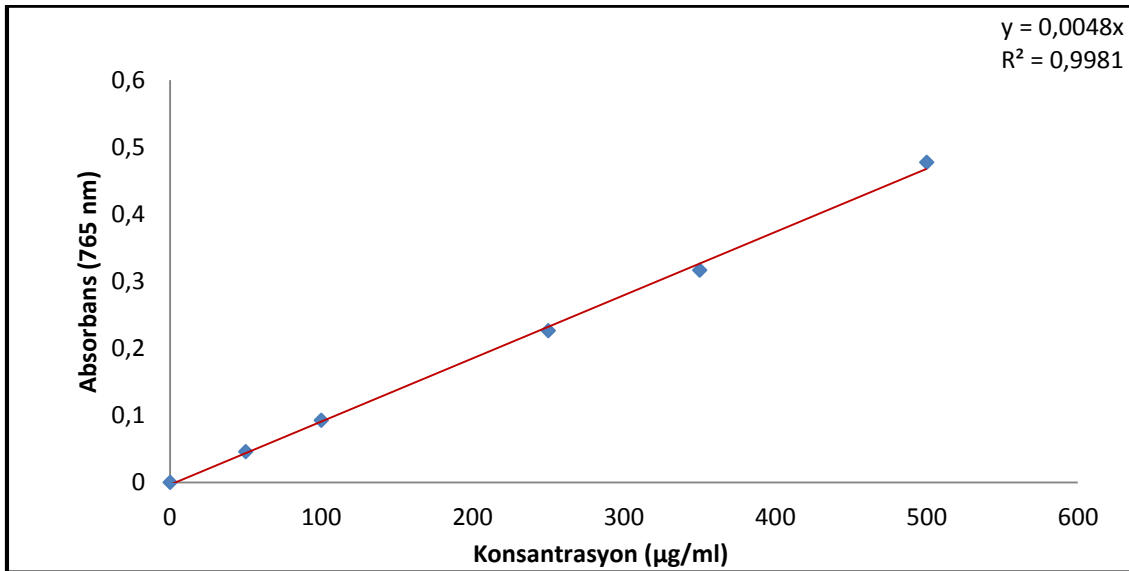
4.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktarı

Badem meyvesinin (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının 0.5 mg/ml lik toplam fenolik bileşen içeriği Folin-Ciocalteus yöntemine göre gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Gallik asit ve *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı 50, 100, 250, 350, ve 500 µg/ml olarak beş farklı seyreltik konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu aralıktaki konsantrasyonların yukarıda da belirtildiği gibi belirli işlemler yapıldıktan sonra, 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

Gallik asit artan absorbans değerine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.1) ve aşağıdaki denklem elde edildi.(4.1).

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0048 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g}) \quad (4.1)$$

Bu denklem kullanılarak *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının toplam fenolik bileşen içeriği gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Badem (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarı 28.16 ± 9.990 µg olarak gallik aside eşdeğer olarak bulundu.



Şekil 4.1. Gallik asidin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri.

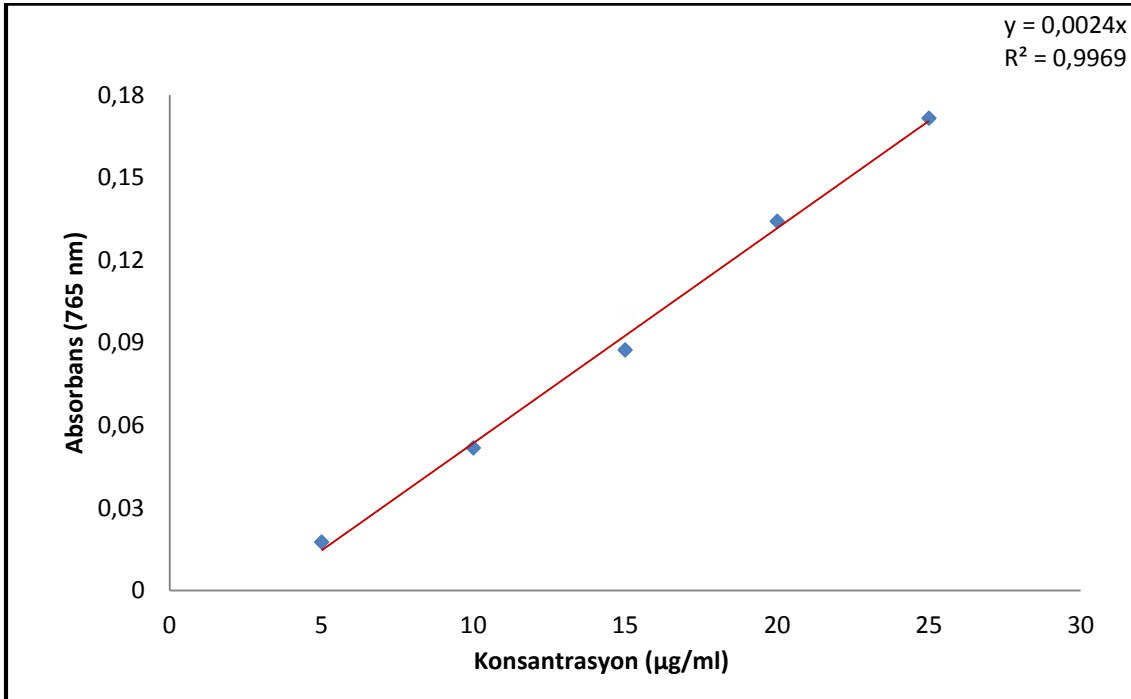
4.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktarı

Badem (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen içeriği quercetine eşdeğer olarak hesaplandı (Zhishen ve ark., 1999). Tez çalışması kapsamında çalışılan badem ekstraktı ve standart olarak kullanılan quercetin çözeltilerinin her ikisinden 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml lik farklı 5 konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu konsantrasyonlar bulgular kısmında belirtildiği üzere belirli işlemler yapıldıktan sonra, 415 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Daha sonra okunan bu değerler aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

Quercetin’in artan konsantrasyonuna karşın *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının değerleri grafiğe taşınmıştır (Şekil 4.2). Bu grafik sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edildi.(4.2).

$$\text{Absorbans (A)} = 0.024 \times \text{quercetin } (\mu\text{g}) \quad (4.2)$$

Bu ifade kullanılarak *A. trichamygdalus* meyvesinin ekstraktındaki toplam flavonoid bileşen içeriği quercetine eşdeğer olarak hesaplandı. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktarı 8.866 ± 0.208 µg olarak quercetine eşdeğer olarak hesaplandı.



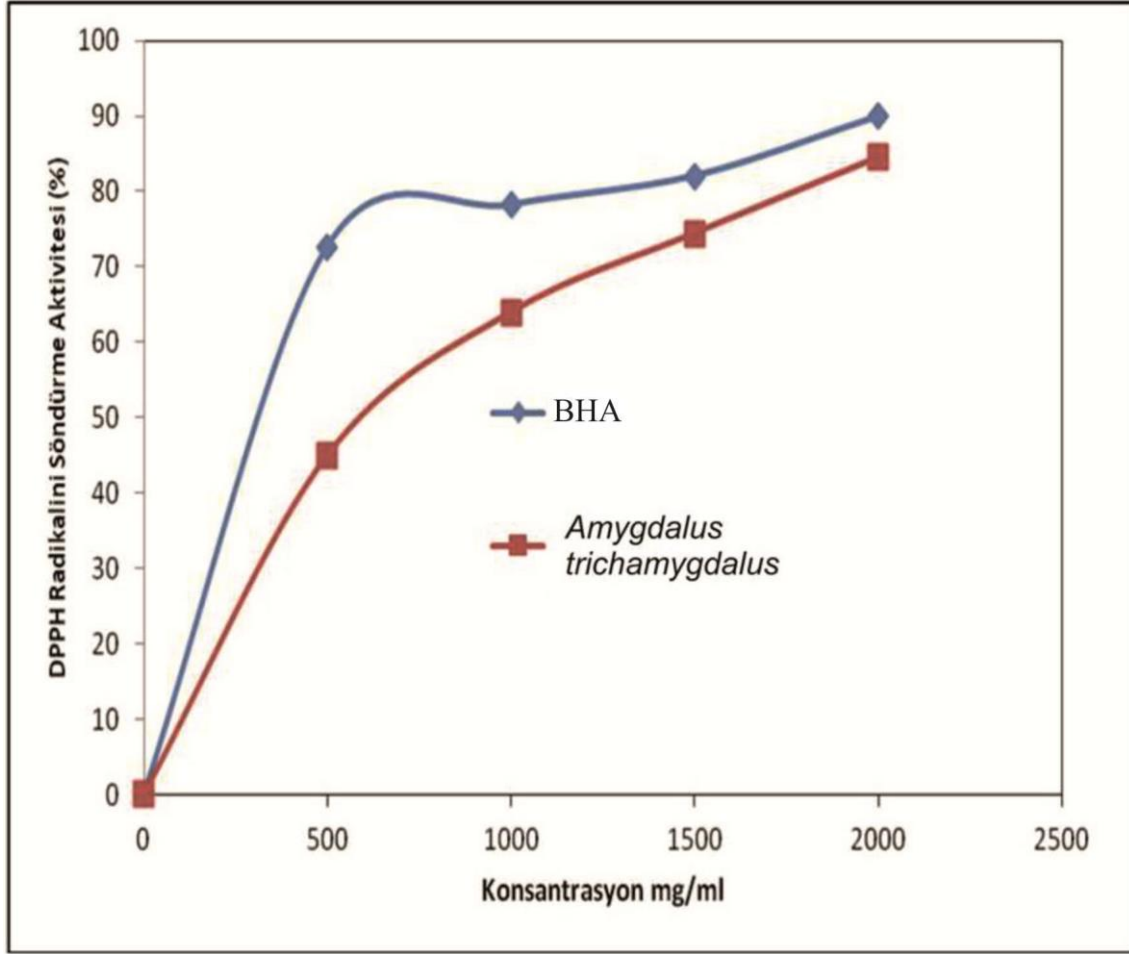
Şekil 4.2. Quercetin’in artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri.

4.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

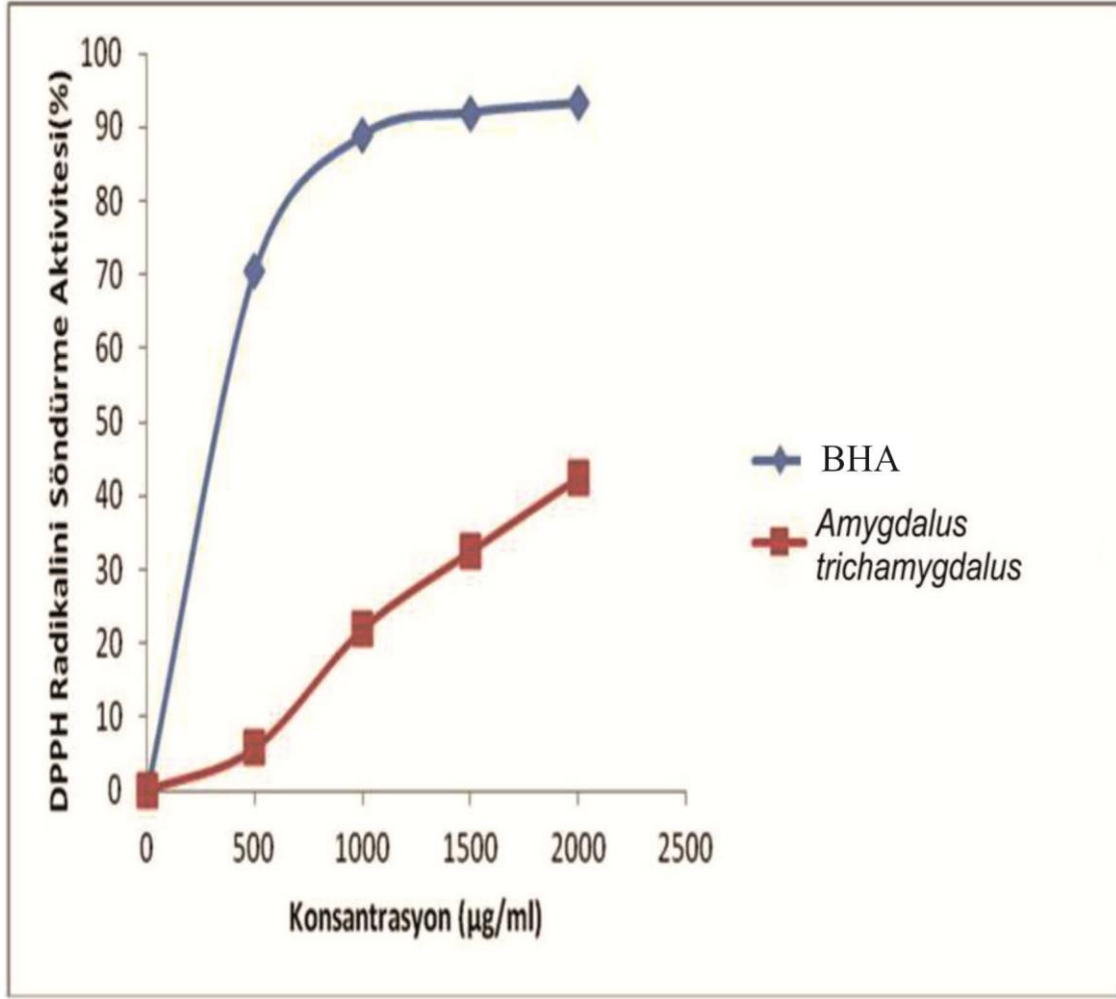
Badem meyvesinin (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının DPPH söndürme aktivitesi Blois yöntemine göre hesaplandı. Burada pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. Badem ekstraktı için bu aşamada iki ayrı konsantrasyon olarak iki ayrı deney yapıldı. Deneyler 0.1 mg/ml ve 1 mg/ml de her iki deney için 500, 1000, 1500, 2000 µg/ml'lik dört ayrı konsantrasyonları hazırlandıktan sonra tezin bulgular kısmında anlatıldığı üzere belirli işlemler yapıldıktan sonra, 517 nm'de absorbans değerleri okundu. Absorbans sonuçları her iki deney için ayrı ayrı % inhibisyon sonuçları hesaplanarak artan konsantrasyona göre grafiksel olarak ifade edildi. % inhibisyon hesaplamaları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.(4.3).

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (4.3)$$

Bu deneyde elde edilen bulgular 500- 2000 arasındaki dört ayrı konsantrasyon aralığındaki badem meyvesinin (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının en yüksek ve en düşük standart sapma değerleri 0.1 mM DPPH çözeltisi için; 84.47 ± 0.147 - 44.96 ± 0.115 aralığında olduğu (Şekil 4.3) 1 mM DPPH çözeltisi için en yüksek ve en düşük konsantrasyon aralığı; 42.496 ± 0.228 ve 5.803 ± 0.786 olarak görüldü (şekil 4.4). Pozitif kontrol olarak çalışılan BHA' nin en yüksek ve en düşük standart sapma değerleri 0.1 mM DPPH çözeltisi için; 93.220 ± 0.069 ve 70.606 ± 0.460 aralığında olduğu olduğu ve 1 mM DPPH çözeltisi için en yüksek ve en düşük konsantrasyon aralığı 89.923 ± 0.150 - 72.68 ± 0.175 görülmüş ve bu değerler % inhibisyon olarak grafiksel olarak gösterildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonu için farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi.



Şekil 4.4. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının yüksek konsantrasyonu için farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi.

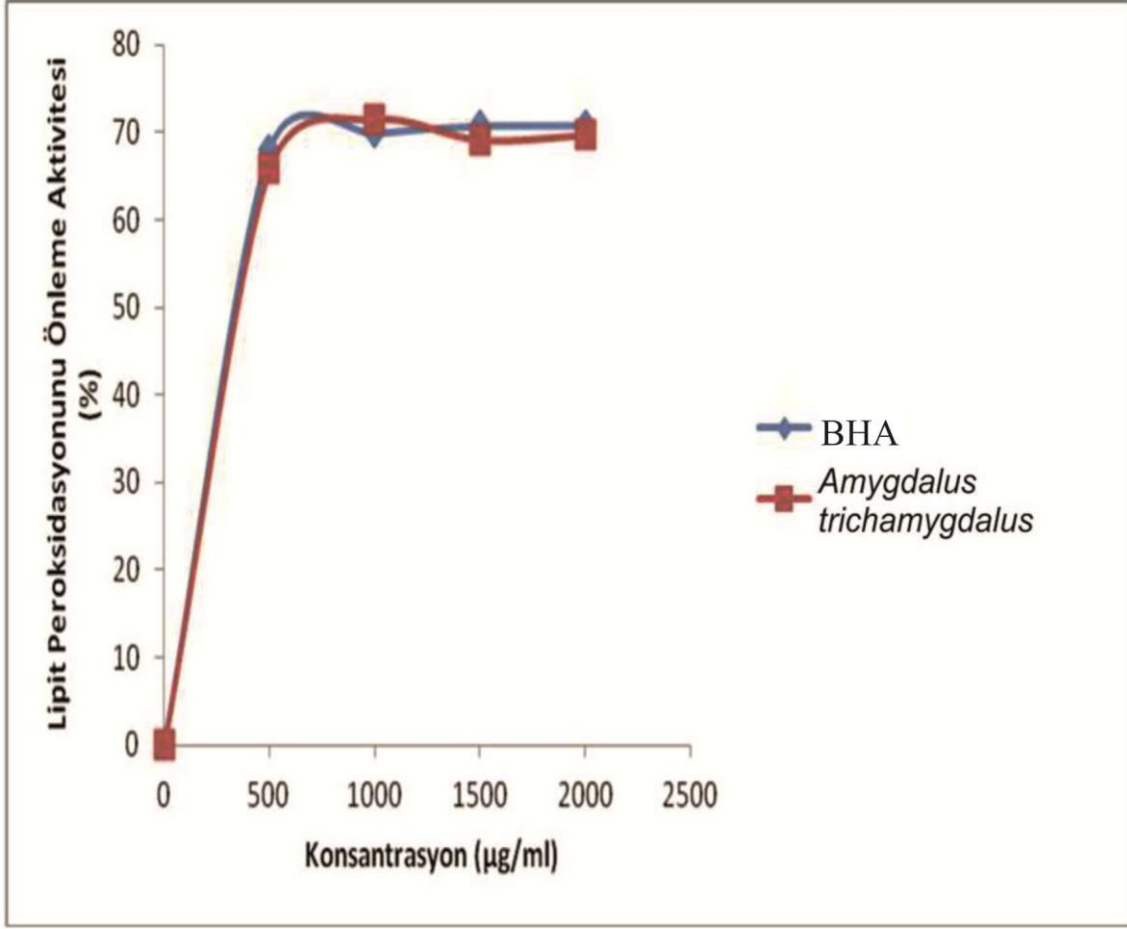
4.4.Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

A. trichamygdalus meyvesinin etanol ekstraktının lipit peroksidasyonu önleme aktivitesini hesaplamak için TBA metodu kullanıldı (Lo ve ark., 2005). Bu metota göre pozitif kontrol olarak BHA kullanıldı. Badem ekstraktı ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA 30 mg/10ml lık çözeltileri için 500, 1000, 1500, 2000 µg/ml'lik dört ayrı seyreltik konsantrasyon hazırlandı ve çalışıldı. Hazırlanan çözeltilere belirli işlemler yapıldıktan sonra 532 nm de UV'de absorbans değerleri okundu. Bu parametrede deneyler iki ayrı kategoride irdelendi. Bir deney düşük konsantrasyonda çalışılırken, farklı bir deneyde 10 kat daha yüksek konsantrasyonda çalışıldı. Bu iki deney için ayrı ayrı absorbans değerleri için % inhibisyon hesaplamaları yapıldıktan

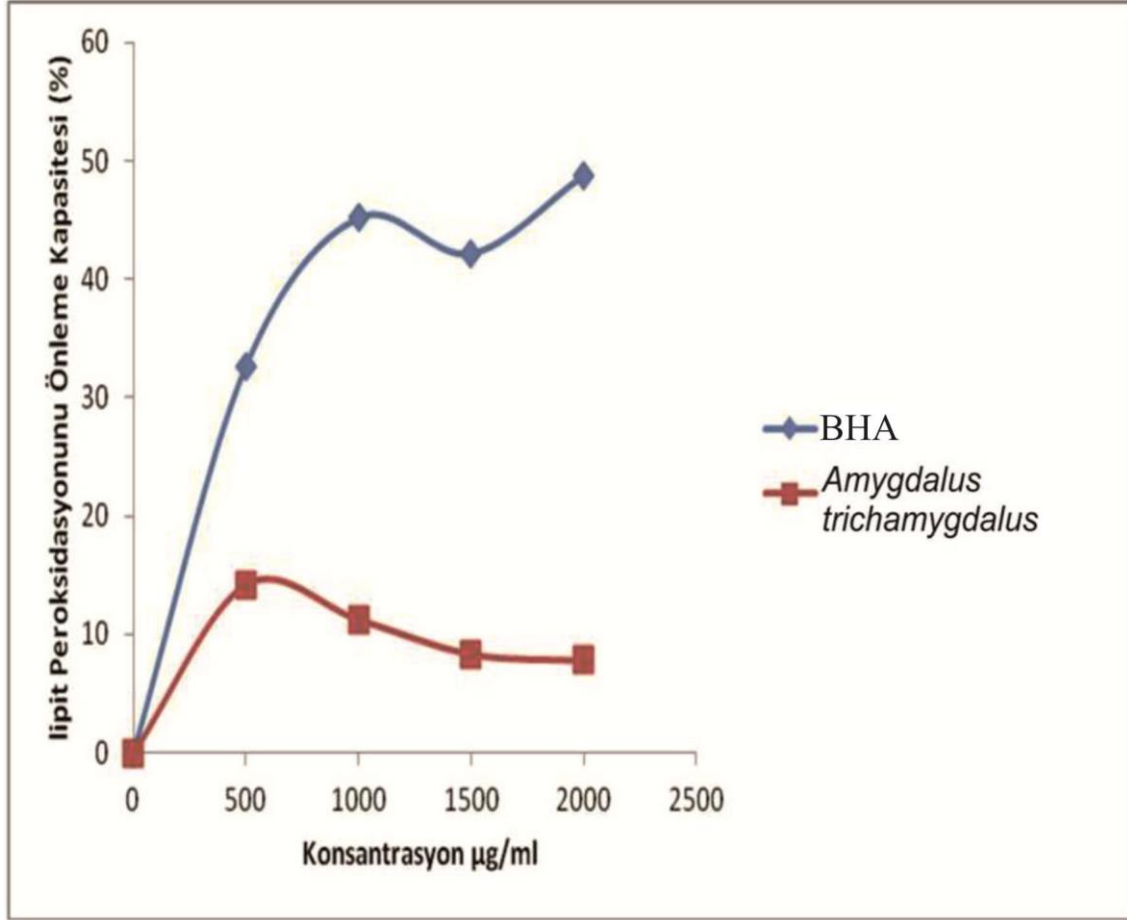
sonra grafiksel olarak da ayrı ayrı ifade edilmiştir. % inhibisyon hesabı aşağıdaki denkleme göre yapıldı.(4.4).

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (4.4)$$

A. trichamygdalus meyvesinin etanol ekstraktının ve pozitif kontrol olan BHA için hazırlanan 500-2000 arasındaki farklı konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri hesaplandıktan sonra standart sapma değerleride hesaplandı. Hesaplama yapıldıktan sonra elde edilen değerler grafiksel olarak ifade edilmeye çalışıldı. Mevcut çalışmadaki meyve ekstraktının ve BHA için yapılan çalışmada; *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının düşük konsantrasyonda ki en yüksek ve en düşük standart sapma aralığı % 69.73 ± 0.0624 - 65.77 ± 0.0435 aralığında değişirken (Şekil 4.5), BHA için bu değerler: % 70.78 ± 0.04 - 68.08 ± 0.081 aralığında olduğu görülmüştür. 10 kat daha yüksek konsantrasyondaki çalışma sonucuna göre en yüksek ve en düşük standart sapma değerleri; *A. trichamygdalus* için; % 42.496 ± 0.228 - 5.803 ± 0.786 , BHA için bu değerler; % 93.220 ± 0.069 - 70.606 ± 0.460 olduğu görüldü (Şekil 4.6). Bu değerlerin karşılaştırması aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonda lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin grafiği (BHA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır).

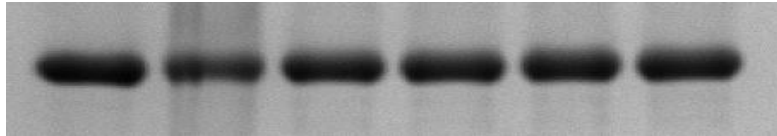
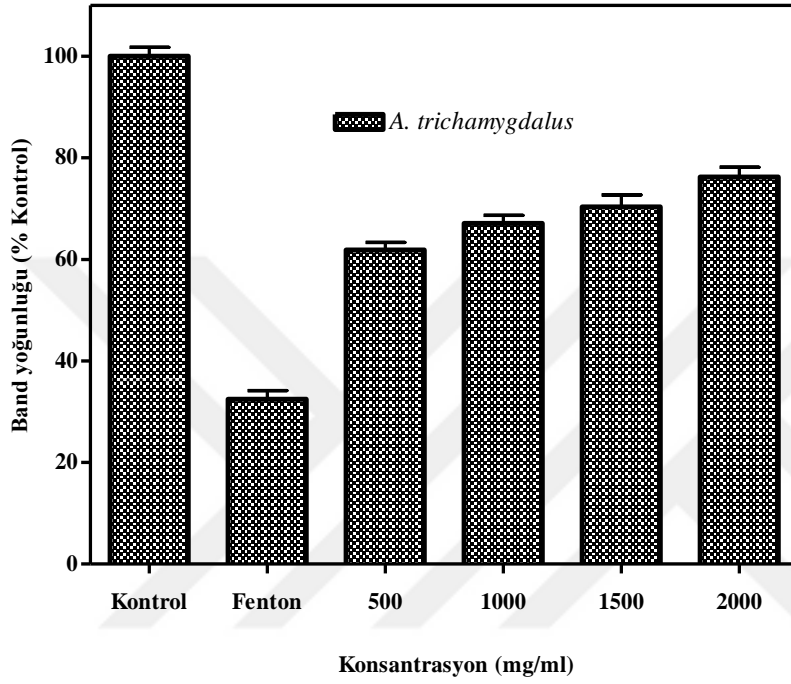


Şekil 4.6. *A.trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının yüksek konsantrasyonda lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin grafiği (BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı).

4.5. Protein Oksidasyonu Önleme Aktivitesi - SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

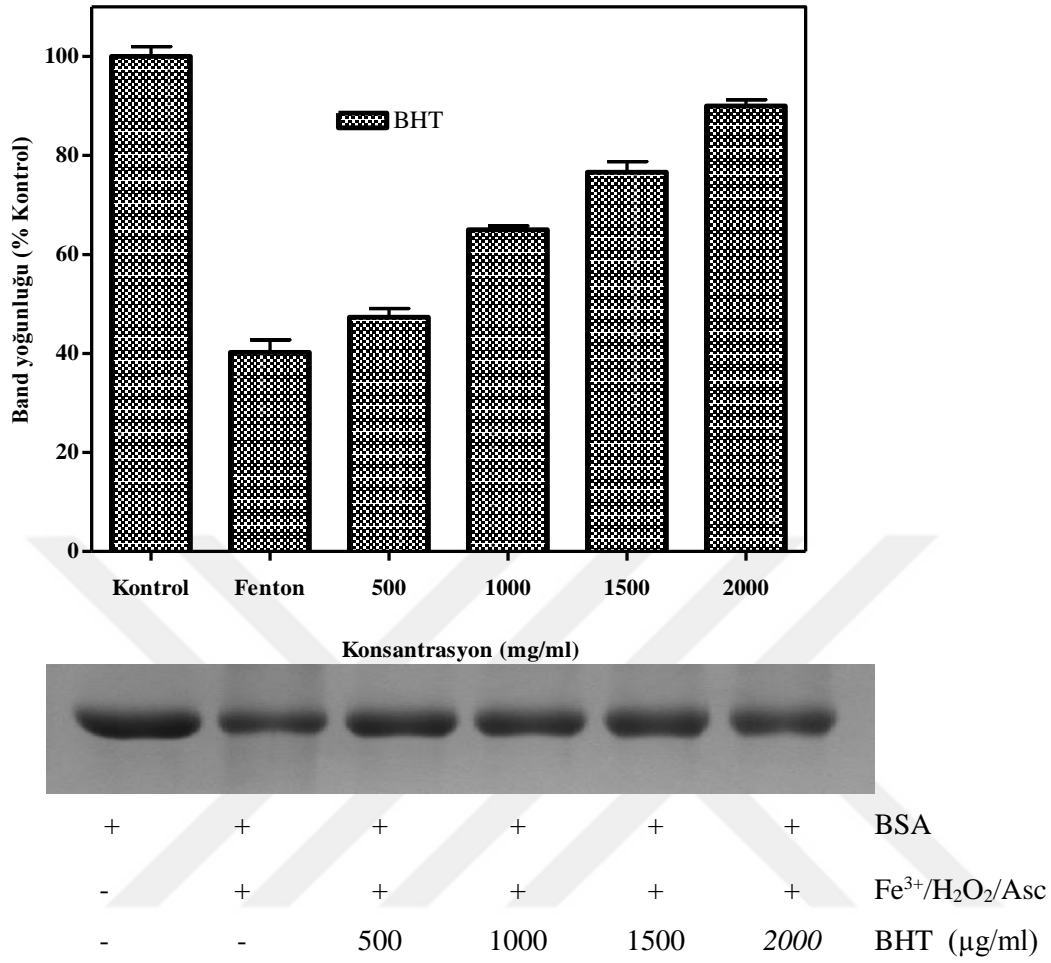
Protein oksidasyonu tayini çalışmasında kullanılan *A. trichamygdalus*'un etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme etkisi daha Önce yapılmış olan Laemmli's (1970) metoduna göre belirlenmeye çalışıldı. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu çalışmada *A. trichamygdalus* ekstraktının ve pozitif kontrol olan BHT için 60 mg/ml'lik konsantrasyonlarda stok çözeltiler 500-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında dört ayrı seyreltik çözeltileri hazırlandı. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme aktivitesi H_2O_2/Fe^{+3} /askorbik asit sisteminin Bovine serum albumin (BSA) proteininde meydana getirdiği zararları koruyucu özelliği yapılan çalışma ile belirlenmeye çalışıldı. Grafikselsel olarak ifade edilmeye çalışıldı.

Bu deneyin sonucunda protein oksidasyonu önleme aktivitesi incelenirken 500-2000 $\mu\text{g/ml}$ dört farklı konsantrasyon aralığındaki *A. trichamygdalus* meyvesinin protein oksidasyonunu önleme aktivitesi % $61.88 \pm 2.50 - 76.23 \pm 3.14$ arasında (Şekil 4.7) pozitif kontrol olan BHT için bu değerler $47.23 \pm 3.09 - 90.40 \pm 2.17$ arasında (Şekil 4.8) olduğu görüldü.



+	+	+	+	+	+	BSA
-	+	+	+	+	+	$\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Asc}$
-	-	500	1000	1500	2000	A.t ($\mu\text{g/ml}$)

Şekil 4.7. *A. trichamygdalus* (A.t) meyvesinin etanol ekstraktının BSA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisinin Sodyum dodesil sülfat-poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmesi. 1.Kuyucuk: BSA 2.Kuyucuk: BSA + $\text{Fe}^{3+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Asc}$ 3.Kuyucuk: BSA + $\text{Fe}^{3+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Asc}$ + 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ A.t 4. Kuyucuk: BSA + $\text{Fe}^{3+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Asc}$ + 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ A.t 5.Kuyucuk: BSA + $\text{Fe}^{3+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Asc}$ + 1500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ A.t 6.Kuyucuk: BSA + $\text{Fe}^{3+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{Asc}$ + 2000 / ml A.t.



Şekil 4.8. BHT' nin BSA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisinin Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmesi. 1. Kuyucuk BSA 2. Kuyucuk: BSA + Fe³⁺ / H₂O₂ / Asc 3. Kuyucuk: BSA + Fe³⁺ / H₂O₂ / Asc + 500 µg / ml BHT 4. Kuyucuk: BSA + Fe³⁺ / H₂O₂ / Asc + 1000 µg / ml BHT 5. Kuyucuk: BSA + Fe³⁺ / H₂O₂ / Asc + 1500 µg / ml BHT 6. Kuyucuk: BSA + Fe³⁺ / H₂O₂ / Asc + 2000 µg / ml BHT

4.6. DNA Oksidasyonu Önleme Aktivitesi-Agaroz Jel Elektroforezi

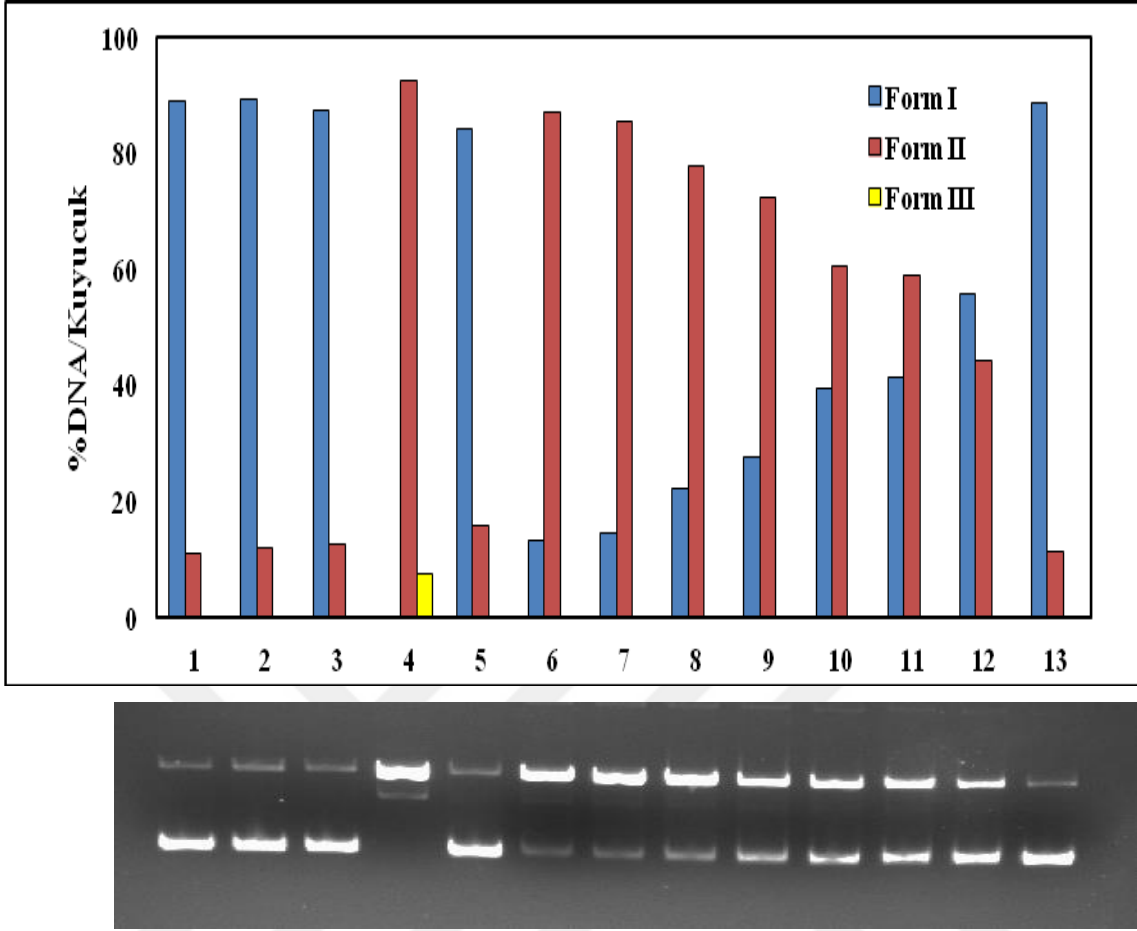
A. trichamygdalus meyvesinin etanol ekstraktının DNA'yı H₂O₂'nin fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisini Agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak tespit edilmeye çalışıldı. Bu çalışma yapılırken plazmit DNA varlığında *A.trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri H₂O₂ + UV işlemi ile okside edilerek jel elektroforezinde DNA kesiminin olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı 50-1000 mg/ml

aralığında yedi farklı konsantrasyon da seyreltik çözeltileri hazırlanmıştır.

Bu çalışmada plazmit DNA varlığında bazı kuyucuklarda yalnızca UV uygulanmış ya da yalnızca H₂O₂ varlığında kuyucuklar oluşturuldu. Bazı kuyucuklarda H₂O₂, UV ve *A. trichamygdalus* meyve ekstraktının farklı konsantrasyonlarda olduğu 13 kuyucuk oluşturularak DNA kesimi görülmeye çalışılmıştır. DNA zincir kesimi % inhibisyon aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.(4.5). Bu değerler grafiksel olarak ifade edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.9)

$$\%I = 1 - [(S_m + a - S_c) / (S_m - S_c)] \times 100 \quad (4.5)$$

Bu çalışma sonucunda DNA'yı H₂O₂ nin fotolizi sonucunda oluşan [•]OH radikaline karşı koruyucu etkisi % inhibisyon olarak hesaplandı ve sonuçlar 11.76-50.26 aralığında bulundu.

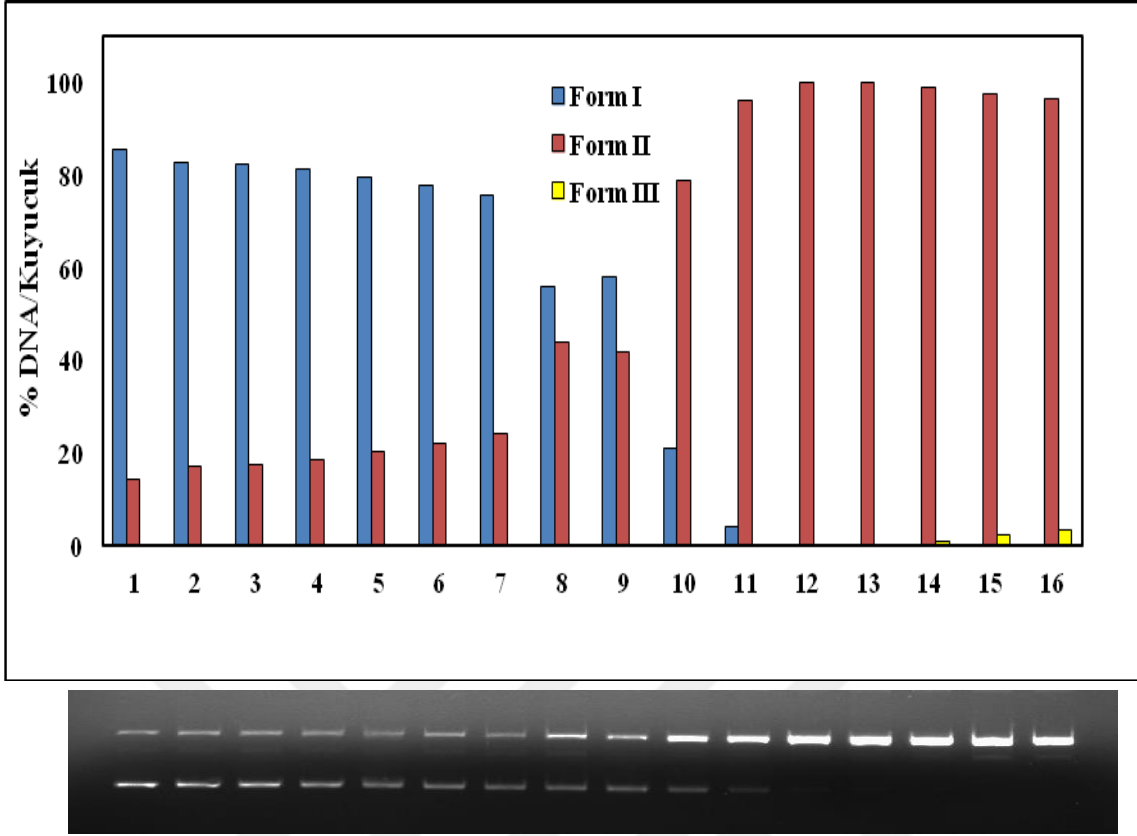


Şekil 4.9. Her kuyucuktaki pBR322 plazmid DNA'nın sc-DNA (Form I), oc-DNA (Form II) ve l-DNA (Form III) yüzdeleri. Farklı konsantrasyonlardaki *A. trichomygdalus* (A.t) meyve ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg/mL) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA) görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu, BioRad Co.) hesaplandı. 1. Kuyucuk: DNA; 2. Kuyucuk: DNA + H₂O₂; 3. Kuyucuk: DNA + UV; 4. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV; 5. Kuyucuk: DNA + UV + 250 µg / ml A.t; 6. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 50 µg / ml A.t; 7. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 100 µg / ml A.t; 8. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 250 µg / ml A.t; 9. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 350 µg / ml A.t; 10. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 500 µg / ml A.t; 11. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 750 µg / ml A.t; 12. Kuyucuk: DNA + H₂O₂ + UV + 1000 µg / ml A.t; 13. Kuyucuk: DNA

Çizelge 4.1. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının DNA hasarı üzerine olan etkisinin incelenmesi

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		form-1	form-2	form-3
1	DNA	91.12	8.78	
2	DNA + H ₂ O ₂	92.12	7.78	
3	DNA + UV	90.06	9.04	
4	DNA + H ₂ O ₂ + UV		94.46	5.54
5	DNA + UV + 250 µg/ml A.t.	89.18	10.82	
6	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 50 µg/ml A.t.	11.55	88.45	
7	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 100 µg/ml A.t.	12.33	87.67	
8	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 250 µg/ml A.t.	26.72	73.28	
9	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 350 µg/ml A.t.	32.40	67.60	
10	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 500 µg/ml A.t.	40.39	59.61	
11	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 750 µg/ml A.t.	42.35	57.65	
12	DNA + H ₂ O ₂ + UV + 1000 µg/ml A.t.	53.40	46.60	
13	DNA	91.75	8.15	

Diğer bir çalışmada plazmid DNA'nın olduğu kuyucukların bazılarında sadece farklı konsantrasyonlarda meyve ekstraktı varken, diğerlerinde ekstrapan Cu⁺² metalı ilave edilerek 16 farklı kuyucuktan oluşan DNA kesim etkisi araştırıldı. Burada da DNA kesim % inhibisyon yukarıda metod kısmında belirtilen eşitlik kullanılarak hesaplandı ve bu değerler grafiksel olarak ifade edilmeye çalışıldı (şekil 4.10). Bu grafikte mevcut çalışmada kullanılan *A.trichamygdalus*'un etanol ekstraktının 50-1000 mg/ml aralığında artan konsantrasyon miktarına göre DNA kesimini engellediği çok açık bir şekilde görülmektedir. Aynı grafikte çalışma sonucunda Cu⁺² iyonunun 50 mg/ml den 1000 mg/ml doğru artan *A.trichamygdalus*'un konsantrasyonunda DNA'yı kestiği çok açık bir şekilde görüldü.



Şekil 4.10. *A. trichamygdalus* (*A.t*) meyvesinin etanol ekstraktının bakır yokluğunda ve varlığında DNA üzerine etkisinin incelenmesi. Elektroforez, etidyum bromür (10 mg / mL) içeren % 1 Agaroz jelde, 1 saat 90 V 500 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2); Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, USA). görüntüleme sistemi ile çekildi ve % kesim hesaplamaları Quantity One programıyla (4.5.2 versiyonu, BioRad Co.) hesaplandı. 1. Kuyucuk: DNA; 2. Kuyucuk: DNA+50 µg/ml *A.t*; 3. Kuyucuk: DNA + 100 µg/ml *A.t*; 4. Kuyucuk: DNA + 250 µg / ml *A.t*; 5. Kuyucuk: DNA + 350 µg/ml *A.t*; 6. Kuyucuk: DNA + 500 µg/ml *A.t*; 7. Kuyucuk: DNA + 750 µg / ml *A.t*; 8. Kuyucuk: DNA + 1000 µg / ml *A.t*; 9. Kuyucuk: DNA + Cu⁺²; 10. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 50 µg / ml *A.t*; 11. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 100 µg / ml; *A.t* 12. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 250 µg / ml *A.t*; 13. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 350 µg / ml *A.t*; 14. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 500 µg / ml *A.t*; 15. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 750 µg / ml *A.t*; 16. Kuyucuk: DNA + Cu⁺² + 1000 µg / ml *A.t*

Çizelge 4.2. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının bakır varlığında ya da yokluğunda DNA kesimi üzerine olan etkisinin incelenmesi

Kuyucuk	Reaksiyon	Form (%)		
		form-1	form-2	form-3
1	DNA	86.17	13.83	
2	DNA + 50 µg/ml <i>A.t.</i>	84.48	15.52	
3	DNA + 100 µg/ml <i>A.t.</i>	84.12	15.88	
4	DNA + 250 µg/ml <i>A.t.</i>	83.65	16.35	
5	DNA + 350 µg/ml <i>A.t.</i>	80.11	19.89	
6	DNA + 500 µg/ml <i>A.t.</i>	79.67	20.33	
7	DNA + 750 µg/ml <i>A.t.</i>	78.33	21.67	
8	DNA + 1000 µg/ml <i>A.t.</i>	56.49	43.51	
9	DNA + Cu ⁺²	58.25	41.75	
10	DNA + 50 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²	20.05	79.95	
11	DNA + 100 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²	5.12	94.88	
12	DNA + 250 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²		100	
13	DNA + 350 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²		100	
14	DNA + 500 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²		98.06	1.94
15	DNA + 750 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²		96.98	3.02
16	DNA + 1000 µg/ml <i>A.t.</i> + Cu ⁺²		95.45	4.55

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve süperoksit anyonu olan (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksi radikali ($\cdot OH$) gibi radikaller belirli etmenlere (stres, çevre kirliliği, sigara, UV, alkol v.b) bağlı olarak insan vücudunda sürekli olarak üretilmektedir. Bu oluşan serbest radikaller antioksidan denge sistemini bozarak oksidatif stresin oluşmasını sağlamaktadır. Oksidatif stres sonucunda birçok hücre hasarına ve hatta ölümüne neden olarak başta kanser olmak üzere diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlılık gibi birçok ölümcül hastalıklara oluşmasına neden olmaktadır. Yapılan çok sayıda çalışmalara göre oksidatif strese neden olan serbest radikallerin oluşmasını ve meydana gelen hastalıkların oluşmasını engelleyen moleküllerin çoğunun bitkilerde mevcut olan antioksidan bileşikler olduğu görülmüştür (Chen ve ark., 2007). Oksidanlar ile antioksidanlar arasında denge hastalıklardan korunmak ve sağlıklı yaşam için esastır (Cornelli, 2009).

Bitki dünyasında en fazla bulunan antioksidan moleküller fenol bileşikler veya polifenol bileşikler, bitkilerin bütün kısımlarında bulunabilir. Fenol bileşiklerin yanısıra bitkilerde en fazla bulunan antioksidan bileşenler flavonoidler, bazı aminoasitler, karoteonidler, A ve C vitamini, organik asitler, glukonadlar, terpenler, kumarinler, sülfidlar, fitatlar, melonoidler, izotiyosiyanatlar, ligninler ve indoller gibi örnekler verilebilir (Nagy ve Attaway., 1992).

Doğal antioksidanların en önemli grubu fenol bileşiklerin şu ana kadar 8 binin üzerinde bileşiği tanımlanmış olup bunlarla ilgili sayısız çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda antioksidan özellikleri çok güçlü olduğu anlaşılan fenol bileşenler hem buldukları bitkileri koruma özellikleri ile hem de mevcut olan birçok hastalığı özellikle kanser, kalp damar hastalıkları, stres, diyabet, erken yaşlılık gibi birçok hastalığı önlediği görülmüştür. Polifenol yada fenol bileşenlerin DNA, protein, lipid gibi yapılara bağlanabilme özelliklerinden dolayı bu yapıları serbest radikallerin zararlarına karşı koruyabilmektedir (Kafkas ve ark., 2006).

Fenolik bileşenlerin sağlıkla ilgili etkisi, bileşenlerin toplam fenol bileşen miktarı yerine, bileşenlerin türevlerinin her birinin içerdiği fenol bileşen miktarıdır (Cemeroğlu, A.P ve Cemeroğlu, B.S., 1998).

Bu tez kapsamında *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı için yapılan deney sonucunda toplam fenolik bileşen içeriği 28.16 µg olarak gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

2016 yılında Adefeghe ve arkadaşları Nijerya'da yetişen bademlerin hem kabuk hemde çekirdeğinin 50-200 µg/ml konsantrasyon arlığında metanol ekstraktlarının fenolik bileşen içeriğine bakmışlardır. Bu çalışmada fenolik bileşen içeriği istatistiksel olarak IC₅₀'ye göre hesaplanmış, çekirdek için sonuç yüksek konsantrasyonda 4.0 ± 0.01 µg gallik aside eşdeğer olarak bulmuşlardır (Adefeghe ve ark., 2016). Burada elde edilen sonucun bu tez kapsamında çalışılan *A.trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının sonucuna paralel ve yakın olduğu söyleyebilir. 2009 yılında yapılan bir çalışma kapsamında, *Cyclotrichum niveum* bitkisinin metanol ekstraktının toplam fenolik bileşen içeriği araştırılmıştır. 500 µg/ml konsantrasyonunda çalışılan bitkinin toplam fenolik bileşen içeriği, 200,9 µg gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Emen, 2009). Bu tezde çalışılan *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının fenolik bileşen miktarı daha düşük bulundu. Başka bir çalışmada Arıduru ve Arabacı 2012 yılında Ciğertaze Otu (*Salvia Officinalis*) bitkisinin etanol ekstraktının 1000 µg/ml konsantrasyonunda, fenolik bileşen içeriği gallik aside eşdeğer olarak 43.55 µg, metanol ekstraktı ise, 23.62 µg olarak hesaplanmıştır (Arıduru ve Arabacı., 2012). Burdaki değerler *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı ile bu çalışma kıyaslandığında, etanol ekstraktına göre daha düşük, metanol ekstraktına göre daha yüksek bulunmuştur.

2011 yılında Che Othman ve arkadaşları tarafından Maleziya bölgesinde yetiştirilen sarımsak ve kırmızı soğanın antioksidan bakımından karşılaştırılması amacı ile bir çalışma yapılmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak deneyler yapılmıştır. Çalışma sonucunda toplam fenolik içerikleri sarımsak için 37.60 µg, kırmızı soğan için 53.43 µg olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla *A. trichamygdalus* meyvesine göre toplam fenolik bileşen içeriği daha iyi bulundu (Che Othman ve ark., 2011).

Isfahlan ve arkadaşlarının 2010 yılında İran bölgesinde yabani olarak doğada yetişen farklı 4 türdeki badem meyvesinin gövde ve kabuklarının antioksidan kapasitelerini karşılaştırmışlardır. Toplanan bademlerin metanol ekstraktları hazırlanmış ve 50-150 µg/ml konsantrasyon arlığında toplam fenolik miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada dört ayrı yabani badem türleri için yüksek konsantrasyondaki fenolik bileşen değerler gövde ve

kabuklar için sırasıyla 122.2 ± 3.11 - 75.9 ± 1.13 – 46.6 ± 0.94 - 18.1 ± 0.15 µg/ml olarak gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır (İsfahlan ve ark. 2010). *A. trichamygdalus* 'un etanol ekstraktının toplam fenik bileşen içeriği karşılaştırıldığında üç badem türünden daha düşük bir badem türünden de daha yüksek olduğu görülmektedir.

Akıllıoğlu ve arkadaşının yapmış oldukları çalışmada kuru fasulyenin ve barbunyanın metanol ekstraktlarının toplam fenolik bileşen içeriği sırasıyla 2.36 ve 3.74 µg olarak hesaplamışlardır (Akıllıoğlu ve Karakaya., 2009). Buradaki değerlerin mevcut tezdeki *A. trichamygdalus* 'un etanol ekstraktının toplam fenolik bileşen değerinden daha düşük olduğu görüldü.

Malayoğlunun 2010 yılında *Rosmarinus officinalis L. bitkisi* ile yaptığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmada, bitkilerin antioksidan özellikleri bitkinin yetiştiği bölge, hasat zamanı, bitkinin kullanılan kısmı, fenolik yapıya ve konsantrasyona, ekstraksiyon yöntemine, ürün ve oksidasyon koşuluna, analitik yöntemlerine göre farklılık gösterebilmektedir (Malayoğlun, 2010).

Bu tez kapsamında çalışılan *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının toplam flavonoid değeri 8,86 µg olarak hesaplanmıştır. Akıllıoğlu ve Karakaya nın 2009 yılında kuru fasulye ve barbunyanın toplam flavonoid değerlerini 0.14 ve 1.27 µg olarak hesaplamışlardır. *A.trichamygdalus* meyvesinin toplam flavonoid miktarı kuru fasulye ve barbunyadan daha fazla olduğu görüldü (Akıllıoğlu ve Karakaya, 2009).

2016 yılında Malezya'da yapılan çalışmada Adefeghe ve arkadaşları bademin toplam fenolik içeriğine ek olarak birde flavonoid içeriğindedir bakmışlardır. Bu çalışmada kullanılan bademin (*Terminalia Catappa L.*) 200 µg/ml konsantrasyondaki metanol ekstraktının toplam flavonoid içeriği IC₅₀ yöntemine göre 1.35 ± 0.001 µg olarak quarcetine eşdeğer olarak hesaplanmışlardır. Çalışmada toplam flavonoid içeriğinin fenolik bileşenden daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmada toplam fenolik bileşen içeriği toplam flavonoid içeriğinin neredeyse 3-4 katı olduğu görülmektedir (Adefeghe ve ark., 2016). Bu tezde çalışılan bademin etanol ekstraktına bakıldığında toplam flavonoid toplam fenolik bileşen içeriğinden daha düşük olduğu ve bu oran (*Terminalia Catappa L.*) bademi ile hemen hemen aynı olduğu görüldü.

2016 yılında İran'da yetişen bir badem türü olan *Prunus dulcis* badem meyvesinin kabukları ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada bu badem türünün kabukları oda sıcaklığında kurutulmuş farklı çözücülerle 200 µg/ml konsantrasyonda

ekstraktları hazırlanmıştır. Bu ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışma 25 ve 50 °C farklı iki sıcaklıkta ve 2 ve 6 saatlik farklı iki süreli inkübasyon işlemi yapılmış ve değerler 695 nm’de okunmuştur. Yapılan bu çalışmada *Prunus dulcis* meyve kabuklarının etanol ekstraktı için inkübasyon süresi arttırılınca hem toplam fenolik hemde toplam flavonoid değerlerinin arttığı görülmektedir. Bu çalışmada aseton ve metanol ile hazırlanan ekstraktta yapılan çalışmada toplam fenolik ve flavonoid bileşen içeriği etanol ekstraktından daha yüksek olduğu da görülmektedir. Bu çalışmadaki meyve kabuğu ile hazırlanan etanol ekstraktı için elde edilen sonuçlar mevcut tezde çalışılan *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı ile kıyaslandığında, *Prunus dulcis* badem kabuğunun fenolik bileşen içeriği daha iyi olduğu görüldü. Toplam flavonoid bileşen içeri ise yaklaşık değerde olduğu görüldü. (Meshkini, 2016)

Choi ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada dağlık bölgede yetişen ve yenilebilen *Alnus firma* (*A. firma*) adlı bitkinin radikal söndürme aktivitesi ve antioksidan içerik analizini değerlendirilmiştir. Çalışmada bitkinin % 70’lik etanol ekstraktı hazırlanmış, ekstraktın toplam flavonoid içeriği 73.82 µg/ml quercetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada yer alan *Alnus firma* (*A. firma*) bitkisinin flavonoid içeriği bu tez kapsamında çalışılan badem meyvesinin etanol ekstraktından çok daha iyi olduğu görüldü. Serçe A. un 2012 yılında yapmış olduğu bir çalışmada Meryama Dikeni (*Silybum marianum* L. Gaertner) tohumunun toplam flavonoid içeriği 19.00 µg/ml quercetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Bu değer *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının toplam flavonoid değeri olan 8.866’ µg/ml çok yakın bir değer olduğu görüldü (Serçe A, 2012).

Asteraceae, civanperçemi *Achillea millefolium* bitkisi ile yapılan antioksidan içerik analizinde bu bitkinin su ile hazırlanan ekstraktında toplam flavonoid bileşen içeriği çiçek kısmı ve yaprak kısmı için ayrı ayrı hesaplanmış ve sonuç olarak çiçek için çok düşük, yaprak için 11 mg/ml olarak quercetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı flavonoid bileşen içeriği, *Achillea millefolium* bitkisinin çiçek kısmından daha yüksek yaprak kısmından daha düşük değere sahip olduğu görüldü (Keser ve ark., 2013). Kargutkar ve Brijesth 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada ananas meyvesinin etanol ekstraktının toplam flavonoid içeri quercetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak değeri 0.17 mg olarak

bulunmuş. Bu sonuç bu tezde çalışılan *Amygdalus trichamygdalus* bitkisinin etanol ekstraktına göre düşük olduğu görülmektedir (Kargutkar ve Brijesh, 2017)

DPPH'in etanoldeki çözeltisi mor renkli olup ve 517 nm'de maximum absorbans veren azot radikallerinden biridir. Antioksidanlar tarafından indirgenğinde rengi soluklaşır sarı renge yakın bir renge dönüşebilir. Rengin soluklaşması bu radikalin spektrofotometri ile daha kolay bir şekilde izlenmesine yardımcı olur. DPPH renginin soluklaşması mevcut olan antioksidanın konsantrasyonu ile direkt ilişkilidir (Frankel ve Meyer, 2000).

Lin ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışma da Kaliforniya'da yetişen bir badem türü olan (*Prunus dulcis*)'un 1mg/ml konsantrasyonunda etanol ekstraktı hazırlanmıştır. Bu badem türü farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerde kavrularak antioksidan içerik analizi ve aynı zamanda DPPH radikali söndürme aktivitesini incelemiştir. Çalışmada sıcaklık artırılmış ve buna paralel olarak da işlem süreleride artırılmış, bu işlemler sonucunda , DPPH söndürme aktivitesinde ciddi düşüş olduğunu tespit etmişlerdir (Lin ve ark., 2016). Bu çalışmada yüksek sıcaklıkta kavrulan badem meyvelerinin kavrulmamış olana göre DPPH söndürme aktivitelerininde çok düşük olduğunu söylemek mümkündür. *Prunus dulcis* bademinin 1mg/ml deki etanol ekstraktının DPPH söndürme aktivitesi bu çalışmadaki *A.trichamygdalus* badem meyvesinin aynı konsantrasyondaki etanol ekstarktına yakın olduğu fakat 0.1 mg/ml deki konsantrasyondan düşük olduğu görülmektedir.

Endonezya'da 2014 yılında yapılmış bir çalışmada, propolis'in etanol, n-hegzan ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda DPPH radikal söndürme aktiviteleri etanol, % 37.170 - n-hekzan, % 38.310- etil asetat ise % 36.807 olarak bulunmuştur (Novilla ve ark. 2014). Mevcut çalışmada Badem meyvesinin (*A. trichamygdalus*) etanol ekstraktının yüksek ve düşük konsantrasyon DPPH çözeltisinde radikal söndürme aktiviteleri sırasıyla, % 42.496-84.47 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *A. trichamygdalus* meyvesinin yüksek ve düşük konsantrasyon DPPH çözeltisi için radikal söndürme aktivitesi literatür çalışmasından daha yüksek çıktığı görüldü.

Başka bir çalışmada Çakır ve arkadaşları Türkiye'de kirve otu olarak anılan çiçekli bir bitki olan (*Teucrium orientale L.*) bitkisinin farklı çözücülerdeki antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Aynı çalışmada metanol, petrol eteri, aseton ve

Kloroform ekstraktları için farklı konsantrasyonlarında çalışmışlardır. Petrol eteri ve Kloroform ekstraktlarının DPPH radikal söndürme aktivitesi çok düşük bulunmuştur. Metanol ve aseton ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarındaki değerler *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının DPPH radikal söndürme aktivitesine den daha düşük olduğu görülmektedir (Çakır ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada, Ciğertaze Otu (*Nigella Sativa*) bitkisinin etanol ekstraktının farklı ekstraktlarının DPPH söndürme aktiviteleri sırayla metanol ekstraktı % 90.89, etil asetat ekstraktı % 90.48, etanol ekstraktı % 86.31 ve aseton ekstraktı % 84.78 olarak bulunmuştur (Arıduru ve Arabacı, 2012). Bulunan bu değerler *Amygdalus trichamygdalus* bitkisinin etanol ekstraktını düşük konsantrasyonda DPPH çözeltisindeki radikal söndürme aktivitesi değerlerine yakın bulunurken yüksek konsantrasyondaki değerlere göre daha yüksek olduğu görüldü.

A. trichamygdalus meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonlarda DPPH söndürme aktivitesinin bu tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan BHA ye çok yakın bir değere sahip olduğu görüldü. Bu değerlerin çalışılmış olan birçok bitkiyle ve meyve ile kıyaslandığında oldukça iyi olduğunu söylemek mümkündür. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktını düşük konsantrasyon DPPH çözeltisi için, radikal söndürme aktivitesinin anlamlı olduğu görülmektedir. DPPH serbest radikallere elektron veren antioksidanlar, DPPH radikallerini etkisizleştirerek meydana gelebilecek birçok hastalık ve zararlara karşı koruyucu özellik gösterebilir (Gülçin ve ark., 2007). *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının düşük konsantrasyonlardaki DPPH radikallerini etkisizleştirme özelliğinin yüksek konsantrasyona göre daha iyi sonuç verdiği deney sonuçları ile kanıtlandı.

Membran lipidlerinin oksidatif hasarla bozulması olayına genel olarak lipid peroksidasyonu adı verilmektedir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerin doymamış olan bağları serbest radikallerle etkileşerek peroksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Bu olay genellikle membrandaki konjuge çift bağlarından bir elektron içeren hidrojen iyonunu koparılması sonucunda yağ asidi zincirinin lipid radikaline dönüşmesi ile başlar. Lipid radikallerinin O₂ ile etkileşmesi sonucunda lipid peroksit radikalleri oluşur. Genel olarak birçok biyolojik reaksiyonlarda lipid peroksidasyonları yıkılması sonucunda melondialdehit gibi aldehitler de oluşabilir. Lipid peroksidasyonlarının konsantrasyonları arttığı zaman membranların akış hızları çok ciddi

bir şekilde düşebilir, bu durum enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Lipid peroksidasyonunu kan plazmasında teşhis edebilmek için genellikle kan plazmasında malonaldehit (MDA) molekülü aranır (Tufan, 2008).

MDA molekülü üç veya dört çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ve membraanlarda iyon akışına müdahale ederek membranlardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olarak, iyon geçişini engeller ve enzim aktivitesine de olumsuz olarak etki eder. Bu özelliğinden dolayı DNA da istenmeyen bazı reaksiyonlara neden olarak mutajenik hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojenik etkiye neden olurlar (Taş, 2006).

Bu tez kapsamında çalışılan *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı için düşük ve yüksek konsantrasyon olmak üzere farklı iki konsantrasyonda çalışma, TBA yöntemi kullanılarak yapıldı. 500-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Düşük konsantrasyondaki lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi % 69.73 - 65.77 aralığında bulundu. BHA için bu değerler % 70.78 - 68.08 aralığında olduğu saptandı. Bu tez çalışmasında *A. trichamygdalus* bitkisinin lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi pozitif kontrol olan BHA' ya çok yakın bir değerde olduğu görülmektedir. *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının düşük konsantrasyonundaki lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin çok iyi olduğu söylenebilir. Yüksek konsantrasyonda için lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi'nde % 42.496 - 5.803 aralığında bulunurken BHA için bu değerler % 93.220 - 70.606 aralığında olduğu görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda *A. trichamygdalus* meyvesi için lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin çok iyi olduğu söylenemez.

Keser ve arkadaşları (2014) Elazığ ilinin Maden ilçesinde yetişen bir badem türü olan *prunus dulcis Mill.*'un antioksidan özellikleri ile DPPH söndürme aktivitesi ve lipid peroksidasyonu önleme aktivasyonuna bakmışlardır. Çalışmada bu badem türü oda sıcaklığında kurutulmuş ve sonrasında da metanol ekstraktı hazırlanarak lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi çalışılmış. Pozitif kontrol olarak BHT kullanılmıştır. Çalışmada yağ asit miktarlarını, oleik asit % 76.23, linoleik asit % 15.43 olarak bulmuşlardır. Çalışmada aynı zamanda yağda çözünen vitamin analizinde retinol (0.35 mg/kg), δ-tocopherol (3.05 mg / kg), α-tokoferol (104.40 mg / kg), Kvitamini (38.25 mg/kg), D vitamini (0.85 mg/kg), β-sitosterol (392.20 mg / kg) ve stigmasterol (263.65 mg / kg) olarak elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda *prunus dulcis Mill* badem

meyvesinin metanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesinin, fenton ve kontrol grupları ile mukayese edildiğinde oldukça iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra DPPH söndürme aktivitesini 1000 mg/ml konsantrasyonda % 87.23 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışma tezde çalışılan *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı ile mukayese edildiğinde sonuçların paralel olduğu görüldü (Keser ve ark., 2014)

Güney Kore’de yetişen su ladini ağacı (*Metasequoia glyptostroboides*) bitkisinden izolasyon sonucunda elde edilen bir diterpenoid olan sugiol’un antioksidan özelliği ve lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi Bajpai ve arkadaşları tarafından 2014 yılında araştırıldı. Çalışmada *M. glyptostroboides* bitkisinin etil asetat ekstraktı hazırlanmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak BHT kullanılmış. Elde edilen sonuçlara göre *M. glyptostroboides* bitkisinin lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi % 75.59 olarak bulunmuş. Burada elde edilen sonuç *A. trichamygdalus* meyvesinin düşük konsantrasyondaki etanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesine yakın bir değer olduğu görülüyor (Bajpai ve ark., 2014).

Serçe A’ un 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada Meryema Dikeni (*Silybum marianum L. Gaertner*) tohumunun lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi 50-250 mg/ml konsantrasyon aralıklarında en yüksek ve en düşük değer % 5.87 ve % 26.14 olduğu bulunmuştur (Serçe, 2012). Yapılan bu tez çalışmasında ise *Amygdalus trichamygdalus* bitkisinin etanol ekstraktının hem yüksek konsantrasyondaki hemde düşük konsantrasyondaki lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi daha yüksek olduğu görüldü.

Koroner arter ektezi (CAE) hastalığı sonucunda artan malondialdehit oranının antioksidan enzimler arasındaki ilişkiyi ortaya atmak için yapılan bir çalışma sonucuna göre CAE hastalarında MDA oranı sağlıklı insanlara göre daha yüksek bulunduğu ve diğer taraftan CAE hastalarında antioksidan enzimi olan glutatyon peroksidaz enziminin de daha düşük olduğu çalışmayla ortaya konulmuştur. MDA ve antioksidan enzimlerinin CAE hastalığının patogenezinde önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır (Çetin, 2011). *A. trichamygdalus* meyvesinin lipid peroksidasyonu önleme aktivitesinin yüksek olması CAE hastalığı ve benzeri birçok hastalığın oluşmasını önlemek amacıyla faydalı olacağı düşünülebilir.

Vücut içerisinde fonksiyonel yapısı bozulan proteinler yeterince hızlı parçalanmadıkları için hücre içerisinde belirli noktalarda birikmeye başlayabilirler. Bu birikme sonucunda mevcut toplanan proteinler daha fazla proteinleri bu yapı içerisine çekerek durumu daha karmaşık hale getirebilirler. Bunların yanı sıra bu birikmenin içerisine çeşitli ağır metaller ve artık metabolitleri de çekmektedirler. Bunu bertaraf edebilecek ya da düzeltebilecek herhangi bir sistem mevcut olmamaktadır. Sonuç olarak bu olaylar sonrasında vücut içerisinde istenmeyen birçok patolojik olaylar ortaya çıkabilmektedir. Bu patolojik sonuçlardan en önemli olanlar arasında erken yaşlanma ve Alzheimer hastalığı olarak görülebilir (Dalle-Donne ve ark., 2003).

Proteinlerin ve enzimlerin oksidatif hasarları sonucunda birçok hastalığın ilerlemesinde ya da ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Oksidatif hasara uğramış aminoasit ya da bu aminoasitlerin türevleri belirli yöntemlerle araştırılarak protein oksidasyonunun boyutu ortaya çıkarılabilmektedir. Bu kapsamda protein oksidasyonu değerlendirilebilmektedir. Protein karbonil içeriği en çok kullanılan belirteç iken 3-Nitrotirozinin peroksinitrit belirteç olarak kullanımı nisbeten düşük olanlar arasındadır. Bu belirteçler kullanılarak mevcut protein oksidasyonu tespit edilmesi etkili antioksidan tedavisi ya da başka tedavi yöntemleri ile protein oksidasyonu önlemek mümkün olabilir (Çakatay ve Kayalı, 2004).

Bu tez çalışmasında *A. trichamygdalus* etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme aktivitesi H_2O_2/Fe^{+3} /askorbik asit sisteminin Bovine serum albumin (BSA) proteininde meydana getirdiği zararları koruyucu aktivitesi 500-2000 mg/ml lik konsantrasyonlar aralığında çalışıldı. Sonuç olarak, *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının BSA'yı % $61.88 \pm 2.50 - 76.23 \pm 3.14$, kullanılan pozitif kontrol olan BHT'nin ise BSA'yı $47.23 \pm 3.09 - 90,40 \pm 2.17$ koruduğu hesaplanmıştır. Bu değerler baz alındığında *A. trichamygdalus* meyvesinin protein oksidasyonu önleme aktivitesi pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında kayda değer olduğu görülebilmektedir. Bu protein oksidasyonu önleme aktivitesi meyve ekstraktının içerisinde bulunan polifenolik bileşik oranının fazla olduğu anlamına gelebilmektedir.

İran'da yetişen bir badem türü olan *Prunus dulcis* badem meyvesinin kabukları ile ilgili yapılan çalışmada antioksidan özelliklerinin yanı sıra protein oksidasyonu önleme aktivitesine de bakılmıştır. Çalışma sonucunda *Prunus dulcis* meyve kabuğunun özütünün oksidatif stres kaynaklı protein oksidasyonunun önleyip önlemediği, SDS-

PAGE kullanılarak analiz edilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda aseton ekstraktının protein oksidasyonunu ciddi bir şekilde engellediğini ortaya konulmuştur (Meshkini, 2016). Bu tez kapsamında *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının protein oksidasyonunu önleme aktivitesi de çok iyi olduğu görülmektedir.

Hindistan'da yetişen ve çay olarak tüketilen *Helicteres isora L.* bitkisinin serbest radikallere karşı DNA hasarı, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu önleme aktivitesi araştırılmış. Çalışmada kullanılan bitki için farklı çözücüler ile ekstraksiyon yapılmış. Çalışma sonucunda farklı çözücülerden elde edilen ekstraktların protein oksidasyonunu önleme aktivitesi jel görüntüleme sisteminde çok iyi bir şekilde görüldüğünü tespit etmişlerdir (Kumar ve ark., 2013).

Yapılan bir diğer çalışmada ise Meryema Dikenî (*Silybum marianum L. Gaertner*) tohumunun protein oksidasyonu önleme aktivitesi bitkinin etanol ekstraktı 50-1000 mg/ml konsantrasyonları arasındaki en düşük ve en yüksek değerler; % 75.74 ± 2.9 – 92.92 ± 3.3 olarak hesapladığı görüldü (Serçe, 2012). Bu literatür sonuçlarına göre elde edilen değerler sunulan bu mevcut çalışmada *A. trichamygdalus* meyvesine göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

2014 yılında yapılan bir çalışmada *Achillea millefolium* bitkisinin protein oksidasyonu önleme aktivitesi H_2O_2/Fe^{+3} /askorbik asit üçlü yapının BSA proteininde meydana gelebilecek hasarı önleme aktivitesi SDS-PAGE protein elektroforez yöntemi kullanılarak hesaplamışlardır. Aynı çalışmada elde edilen sonuçlar 50-500 mg/ml konsantrasyon aralığında % 66 ± 1.7 - 92 ± 2.6 sonuçlarını elde etmişlerdir (Emen ve Ark., 2014). Elde edilen sonuçlara göre değerler *A. trichamygdalus* meyvesine göre daha yüksek olduğu görüldü.

Canlılarda özellikle de insanlarda, DNA'da meydana gelebilecek hasarlar bir sonraki nesillere aktarıldığı için genetik bilginde değişimine sebep olabilmektedir. Normalde DNA yapı olarak kendisi de oluşan hasarı tamir edebilecek özelliğe sahiptir. Fakat bu hasar ciddi boyuta ulaştığı zaman DNA bu hasarı tamir edemeyecek hale gelebilir. Meydana gelen hasarlar kontrol altına alınamazsa ya da engelenmez ise beraberinde bazı ciddi sorunlar ortaya çıkabilir. Diyetle alınan bazı besin kaynakları DNA hasarına neden olurken, alınan bazı gıdalarda bunun aksine DNA hasarını önleme anlamında çok ciddi bir öneme sahiptirler. Son zamanlarda DNA'da oluşabilecek hasarları önlemek maksadıyla çok fazla çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmaların çoğunda

bitkilerin sahip oldukları bazı kimyasal bileşenlerin yüksek antioksidan özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bitkilerde mevcut olan bu kimyasal bileşenlerin özellikle de polifenollerin fotokimyasal yapılarının DNA hasarını önleme anlamında çok ciddi bir öneme sahip olduğu birçok çalışmada ıspatlanmıştır (Capecka ve ark., 2004).

Mevcut çalışmada *A. trichamygdalus*'nın etanol ekstraktının DNA'yı H₂O₂'nin fotolizi sonucunda oluşan OH⁻ radikale karşı koruyucu etkisi 50-1000 mg/ml konsantrasyon aralığında % inhibisyon değeri 1000 mg/ml konsantrasyonda % 50.26 olarak bulundu. Bu çalışmada kullanılan bitkinin konsantrasyonu artırıldığında DNA' da oluşabilecek hasarı daha iyi önlediğini çok rahat bir şekilde görebilmekteyiz. 2009 yılında yapılan bir çalışmada *Hypericum scabroides* (HS) ve *Hypericum triquetrifolium* (HT) bitkilerinin etanol ekstraktlarının DNA'yı H₂O₂'nin fotolizi sonucunda oluşabilecek hasara karşı koruma etkisi araştırılmıştır. 400 µg/ml lik konsantrasyonda bu bitkilerin DNA kesimini önleme yüzdeleri sırasıyla, % 97.00 ± 2.6 - 95.61 ± 2.6 olarak bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlara göre bu bitkilerin DNA kesimini önleme aktiviteleri mevcut çalışmadaki bitkinin etanol ekstraktına göre daha iyi sonuç verdiği görüldü (Kızıllı ve ark., 2009).

2010 yılında yapılan bir çalışmada sarımsak ve çörek otunun DNA hasarına karşı koruyucu özelliği araştırılmıştır. Bu çalışmada bitkiler farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Bu bitkilerden sarımsak, 6.25 - 12.5 mg/dl konsantrasyon aralığında DNA kesimini daha iyi önlediğini diğerinde ise, 1.56 - 3.12 mg/dl konsantrasyon aralığında DNA kesimini daha iyi önlediğini bulunmuştur (İbrahim B, 2010). Bu çalışmadaki sonuçlar *A. trichamygdalus* meyvesi ile kıyaslandığında, *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının DNA hasarını önleme aktivitesinin daha iyi bir sonuç verdiğini söylemek mümkündür.

Yapılan farklı bir çalışmada *Mentha longifolia* bitkisinin DNA hasarını önleme aktivitesi araştırılmıştır. Aynı çalışmada bahsedilen bitkinin DNA kesimini önlemediği araştırma sonucunda bulunmuştur (Güzel ve ark., 2014). Fakat *A. trichamygdalus* meyvesinin DNA kesimini önleme aktivitesinin çok iyi olduğu çalışma sonucunda görülebilmektedir.

Malatya'da yetişen farklı iki tür kayısı ile 2012 yılında yapılan bir çalışmada, Şekerpare ve Kaba aşısı denilen türdeki kayısıların etanol ekstraktlarının DNA'yı H₂O₂'nin fotolizi sonucunda oluşabilecek hasara karşı koruma aktivitesi bir tez

kapsamında çalışılmıştır. Araştırma sonucunda Şekerpare ve Kaba aşı için 2.5 mg/ml konsantrasyonunda DNA kesimini önleme aktiviteleri sırasıyla, % 11.16 - 27.94 olarak bulunmuştur (Topal N, 2012). Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktı ile karşılaştırıldığında *Amygdalus trichamygdalus* bitkisinin DNA kesimini önleme aktivitesi çok daha iyi olduğu görüldü.

Birçok metalin özellikle ağır metallerin eksikliğinde ya da fazlalığında insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri yapılan birçok çalışmada sabitlenmiştir. İnsan sağlığına olumsuz etkileri yanı sıra birçok canlıya da özellikle bitkilere zararları olduğu binmektedir. Doğayı kirleten ağır metaller bununla birlikte doğada yaşayan birçok canlıya da dolaylı olarak etki etmektedir. Doğayı kirleten metaller bitkilerin vejetatif organlarını fizyolojik olarak etkilemektedir. Yukarıda söz edilen ağır metaller arasında bakır (Cu), çinko (Zn), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), krom (Cr), civa (Hg) v.b. gibi birçok metalde sayabiliriz. Sayılan metallerin özellikle DNA hasarı üzerine olan etkileri bilinmektedir. Bu metallerin çoğu karsinojenik özelliğe sahiptirler karsinojenik özelliğe sahip olan birçok madde özellikle DNA ya zarar verdiği çalışmalarla kanıtlanmıştı. Bakır (Cu) insanlarda ve diğer canlılarda belirli oranlarda olması gereken bir metaldir. Fazlası ya da eksigi insanlarda ve bitkilerde ciddi sıkıntılara neden olabilmektedir. Özellikle fazlalığı da insanlarda bakır zehirlenmesi bitkiler de ihtiyacından fazla bulunması halinde DNA'nın hasar görmesine neden olabilmektedir. Bu nedenden dolayı da fotosentez işleminin bozulması söz konusu olabilir (Okçu M. ve ark., 2009).

Mevcut çalışmadaki *A. trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının Cu^{+2} iyonu varlığında ya da yokluğunda DNA kesim etkisi araştırıldı. Çalışmada Bakır (Cu^{+2}) iyonunun DNA kesimini artırdığı *A. trichamygdalus* etanol ekstraktı ise bu kesimi engellediği çok açık bir şekilde görüldü.

Yapılan çalışma kısaca özetlenirse; çalışmada kullandığımız *A.trichamygdalus* meyvesinin etanol ekstraktının antioksidan aktivitesinin birçok bitki ile mukayese edildiğinde iyi olduğunu söylemek mümkündür. *A. trichamygdalus* meyvesinin vücuda zarar verebilecek radikallere karşı koruma aktivitesi oldukça iyi olduğunu görülebilmektedir. DPPH radikalini söndürme aktivitesi, lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi ve H_2O_2 'nin fotolizi sonucu oluşan DNA hasarını önleme aktivitesinde yine karşılaştırılan birçok bitkiye göre oldukça iyi olduğu görüldü.

İlk çağlardan beri bitkiler hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır. Bitkilerin hastalıkları tedavi edebilme özellikleri içerilerinde barındırdıkları özel moleküllerden kaynaklanmaktadır. Bilim adamları günümüze kadar sürekli bu molekülleri keşfetmeye çalışmıştır. Bizde bu çalışmamızda badem meyve ekstraktını antioksidan özelliklerini araştırdık. Yaptığımız çalışma kapsamında badem meyvesinin ekstraktında önemli antioksidan moleküllerden olan toplam fenolik ve flavonoid miktarını belirlemeye çalıştık. Aynı zamanda DPPH radikal söndürme aktivitesi, protein oksidasyon ve lipid peroksidasyon önleme aktiviteleri ne bakıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar badem meyve etanol ekstraktının önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca DNA hasarını önleme aktiviteside bu çalışmada değerlendirilmiş olup badem meyve etanol ekstraktının DNA hasarınıda önemli ölçüde önlediği tesbit edilmiştir.

Badem meyve ekstraktının tedavide kullanılabilmesi için etken madde izolasyonu ve bu maddelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda test edilmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Adefeghe, S.A., Oboh, G., Oyeleye, S.I., ve Ejakpovi, I., Ganiyu, O., Sunday, I.O., ve Isac, E., 2016. Elektrojenetik, antihipertansif, antidiyabetik, antioksidatif özellikleri ve fenolik kompozisyonları of almond fruit(*Terminalia Catappa L.*) Parts (Null and Drupe)- In Vitro. *Journal of Biochemistry*, ISSN 1745-4524.
- Akilloğlu, H.G., Karakaya, S., 2009. Effect of some domestic cooking methods on antioxidant activity, total phenols and total flavonoid content of common beans. *Akademik Gıda*, 7(6): 6-12
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *5. Sağlık Dizisi, Mimoza Yayınlar*. Konya No:38
- Alsberg, C., Schwartze, E. W., 1919. "Pharmacological action of cadmium." *Journal of Pharmacol Experimental Therapeutics*, 20:504-506.
- Altınışık, M., 2000. *Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar*. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın. Tıp Fakültesi Ders Notları.
- Ames, BN., Magaw, R., Gold, LS., 1987. Ranking possible carcinogenic hazards. *Science*, 236: 271-280.
- Anonim, 2008. <http://www.karmabilgi.net/mutasyon-nedir-mutasyon-orneklere> (Erişim tarihi: 16,11,2017)
- Anonim, 2016. <http://yumurtali-ekmek.com/antioksidan-nedir> (Erişim tarihi:16,11,2017).
- Arcan, İ., 2005. *Characterization and modification of antioxidant proteins from plant materials*. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 8-12.
- Ardağ, A., 2005. *Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 6-14
- Arıdurur, R., Arabacı, G., 2012. Çiğertaze Otu (*Salvia Officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 17: Cilt, 2. Sayı, s. 241-246.
- Aruoma, O. I., 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 75(2): 199- 212.

- Bajpai, V.K., Sharma, A., Kang, S.C., ve Beak, K.H, 2014. Antioksidant, lipid peroksidation inhibition and free radical scanenging efficiacy of a diterpenoid compound sugiol izolated from *metasequoia glyptostroboides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 9-15
- Balasundram, N., Sundram ,K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**: 191– 203.
- Baytop, T., 1984. *Türkiye’de bitkiler ile tedavi*, İstanbul Üniversitesi Yayınevi. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, No. 40, İstanbul, 240–376.
- Blois, M.S. 1958. Antioksidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**: 1199–1200
- Boyer ,J., Pascolo, S., Richard GF., Dujon ,B.,1993. Sequence of a 7.8 kb segment on the left arm of yeast chromosome XI reveals four open reading frames, including the CAP1 gene, an intron-containing gene and a gene encoding a homolog to the mammalian UOG-1 gene. *Yeast*, **9**(3): 279-87
- Bruce, A., 1987. Deletary recammendation in cancer prevention Ann. *Clinical. Resesearch*, **19**: 313-320.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **15**: 186-190.
- Burk, R.F., Nishiki,K., Lawrence, R.A., Chance, B., 1978. Peroxide removal by selenium-dependent and seleniumin-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **253**, (1): 43-46
- Cadenas, E., Packer, L., 2002. *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- Capecka, E.A ., Mareczek, M., Leja. 2004. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food in Chemistry*, **93**: 223-226.
- Carlberg , I., Mannervik, B, 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. *Glutathione reductase assays. Methods in Enzymology*, **113**: 484-495.
- Cemeroğlu, A.P., Cemeroğlu, B.S., 1998. Sağlık açısından gıda fenolikleri. *Gıda*

Teknolojisi, 3(9): 52-55.

- Che, Othman, S.f., Idid, S.Z., Koya, M.S., Rehan, A.M ve Kamarudin, K.R, 2011. Antioxidant study and red onion: a comparative study pertanika. *Journal of Tropical Agricultural Science*, 34 (2): 253-261.
- Chen, H.Y., Lin, Y.C., Hsieh, C.L., 2007. "Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs", *Food Chemistry*, 104: 1418-1424.
- Choi, S.I., Lee, J.S., Lee, S., Lee, J.H., Yang, H.S., Yeo, J., Kim, J.Y., Lee, B.Y., Kang, I.J, ve Lee, O.H. Radical Scavenging-linked Anti-adipogenic activity of alnus firma extracts 2017. *International Journal of Molecular Medicine*. Doi, 10: 3892/ijnm.3221.
- Cornelli, U., 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27: 175–94.
- Çakatay, U., Kayalı, R., 2004. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35: 140-149.
- Çakır, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yıldırım, A., Küfrevioğlu, O.İ., 2005. Antioxidant activities of the extracts and components of *teucrium orientale* L. *Turkish J Journal of Chemistry*, 30: 483 – 494.
- Çetin, Ç., 2011. *Koroner arter ektazi hastalarda oksidatif DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidant enzimler*. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dalle-Donne, I., Guistraini D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani A., 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*, 9(4) : 169-176.
- Dilas, S.M., 2012. Canadanovic-Brunet JM. Antioxidants in food. *Chemistry & Industry*, 56 (3): 105-112.
- Dokuzoğuz, M., Gülcan, R., 1973. Ege bölgesi bademlerinin seleksiyon yoluyla islahi ve seçilmiş tiplerin adaptasyonu üzerine araştırmalar. *TÜBİTAK*, No: 22.
- Emen, S., 2006. *C.niveum bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan ve DNA'yi serbest radikallere karşı koruma aktivitelerinin araştırılması*. Yüksek Lisans tezi. Dicle Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Emen, S., Kızıl, M., Kızıl, G., Altaş, S., 2014. *Achillea millefolium* bitkisinin antioksidan, radikal söndürücü ve protein oksidasyonunu önleme aktivitesinin

araştirilmesi. **2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi**. P-505.

- Frankel, En., Meyer, A.S., (2000). The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1925-1941.
- Fukuhara, K., Miyata, N., 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **8**: 3187-3192
- Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signal*, **19**: 1807-19.
- Godbout, J.P., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2004. a-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunol*, **149**: 101–109.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Kumar, R., et al., 2012. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer. a case control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **13**: 6295-8.
- Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M., Apak, R., 2005. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health: Talanta*, **65** (5): 1226-1232.
- Gülbahar, Ö., 2007. Protein oksidasyonun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, **10** (1): 43-48.
- Gülçin, İ., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, **21**; 354-361.
- Güzel, V., Çeken, B., Ertaş, A., Kızıl, M., 2014. Aromatik Amin-bazlı ilaçlardan oluşan fenol radikallerinin meydana getirdiği DNA hasarı üzerine mentha longifolia bitkisinin koruyucu özelliğinin araştırılması. **2. İlaç Kimyası Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi**. S-504.
- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, **49**:1341–1348

- Halliwell, B., Gutteridge., 1999. *JMC. Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Pres. Inc, London.
- Hem, 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.
- Heller, W., Forkmann, G., 1993. *Biosynthesis of flavonoids, The flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London, 499-535.
- Heves, M.D., (2008). *Akyıldız (Ornithogalum sigmoideum freyn et Sint.)'in antioksidan aktivitesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Isfahlan, A.J., Mahmoodzadeh, A., Hassanzadeh, A., Heidari, R., Jamei, R., 2008. Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from Iranian almond (*Prunus amygdalus* L.) hulls and shells *Turk Journal of Biology*, **34**: 165-173
- İbrahim, B., 2010. *Hücre kültürü ortamında çörek otu (nigella sativa) ve sarımsak (allium sativum) ekstraktlarının DNA hasarı üzerine etkisinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgu, t A., Türemiş, N., Kargı, S.P., Cabaroğlu, T., 2006. Bazı Üzümü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri. **2. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu**, Konya.
- Kargutkar, S., Brijesh S., 2017. Anti-inflammatory evaluation and characterization of leaf extract of Ananas comosus. *Inflammopharmacology*. Doi: 10.1007/s10787-017- 0379-3.
- Keser, S., Demir, E., ve Yılmaz, Ö., 2014. Phytochemicals and antioxidant activity of the almond kernel (*prunus dulcis* Mill.) from turkey. *Journal of Chemistry Society of Pakistan*, 36:3.
- Keser, S., Çelik S., Türkoğlu, S., Yılmaz, Ö., Türkoğlu, İ., 2013. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *achillea millefolium* l. *Turkish Journal of Pharmacy Science*, **10** (3): 385-392.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33**(2): 110-118.
- Kızıl, G., Kızıl, M., Çeken, B., 2009. Protective ability of ethanol extracts of

- hypericum scabroides* Robson & Poulter and *hypericum triquetrifolium* Turra against protein oxidation and DNA damage. *Food Science and Biotechnology*, **18**: 130-136.
- Kopani, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P., Biró, C., 2006. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, **364**: 61-66.
- Kulaksız, G., Sancar A., 2007. Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Turkish Journal of Biochemistry*, **32** (3): 104-111.
- Kumar, S.V., Kumar, A.T., Sureshwer, S.P., Chandra, P.M., Ravindra, N.M., 2003. Micronutrients, antioxidants, and carcinoma of the gallbladder. *Journal of Surgical Oncology*, **84**: 31-35.
- Kumar, V., Sharma, M., Lemos, M., ve Shriram, V., 2013. Efficacy of *Helicteres isora* L. against free radicals, lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. *Journal of Pharmacy Research*, **6**: 620-625.
- Küden, A.B., Küden, A., Bayazit, S., Çömlekçioğlu, S., İmrak, B ve Dikkaya, Y.R., 2014. *Badem Yetiştiriciliği*. TAGEP Proj No: 5.2.3.1.
- Li, Y., Xue, Q., Chen, L., et al 2004. Research on relationships of gastric cancer with serum trace elements, *Helicobacter pylori* and COX-2 in gastric tissue. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **21**: 107-110.
- Lin, J.T., Liu, S.C., Hu, C.C., Shyu, Y.S., Hsu, C.Y., ve Yang, D.J., 2016. Effects of roasting temperature and duration on fatty acid composition, phenolic composition, Maillard reaction degree and antioxidant attribute of almond (*Prunus dulcis*) kernel. *Food Chemistry*, **190**: 520-528.
- Lo, K.M., Cheung, C.K., 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *Alba*. *Food Chemistry*, **85**: 533-539
- Malayoğlu, H.B., 2010. The antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Hayvansal Üretim*, **51**(2): 59-67.
- Malo, C., Wilson, J.X., 2000. "Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles". *Journal of Nutrition*, **130**: 63-69.
- McCord, J.M., Fridovich I., 1969. An enzymic function for erythrocyte superoxide dismutase (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, **244** (22): 6049-6055.
- Meshkini, A., 2015. Acetone extract of almond hulls provides protection against

- oxidative damage and membrane protein degradation. *Journal of Acupuncture Meridian Study*, **9(3)**: 134-142
- Mikdat, Ş., Hakan, Y., Kadir, U., Y., 2010. Ergani ilçesinde seçilen badem (*Prunus Amygdalus L.*) genotiplerinin performanslarının belirlenmesi. selçuk üniversitesi, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimler Dergisi*, **24(4)**: 1-8.
- Nagy, S., Attaway, J.A., 1992. Anticarcinogenic activity of phytochemicals in citrus fruit and their juice products. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **105**: 162-165
- Novilla, A., Nawawi, A., Sugihartina, G., Widowati, W., 2014. Antioxidative and antibacterial activities of Indonesian propolis extracts against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) in vitro. *Çukurova Medical Journal*, **39(2)**: 224-233
- Okçu, M., Tozlu, E., Kumlay, M.A., Pehlivan, M., 2009. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri. *Alınları Dergisi*, **17(B)**: 14-26.
- Özsoy, B., 2003. Badem piyasası. <http://www.ito.org.tr/itoyayin/0009998.pdf>.
- Pillia, G.R., 2004. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Letters*, **208**: 163-170.
- Refik, K., Ufuk, Ç., 2004. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *İstanbul Üniversitesi Dergisi*, **35**: 2s.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga G., Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20(7)**: 933-956.
- Saldamlı, İ., 2007. *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara. 463-492
- Serçe, A., 2012. *Meryama dikenli (Silybum marianum L. Gaertner) tohumunun antioksidant aktivitesi, oksidatif DNA hasarı ve protein oksidasyonu önleyici etkisinin araştırılması*. Doktora Tez. Dicle Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Shacter, E., 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymology*, **319**: 428-436.
- Shacter, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, **32**: 307-32.
- Sinclair, A.J., Bernad, A.H., Lunec, J., 1990. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, **43**: 334-334.

- Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.B., Rai, M., (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata), *Scientia Horticulturae*, **108**: 233-237.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 15–178.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in protein. *Amino Acids Journal*, **25**: 207-218.
- Stahl, W., Sies, H., 1993. Physical quenching of singlet-oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of New York Academy of Sciences*, **691**: 10–19.
- Taş, M., 2006. *Futbolcularda sürat ekzersizlerinin serum süperoksit, katalaz ve malondialdehit düzeylerine etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı. Erzurum.
- Tekman, S., Oner, N., 1998. *Genel Biokimya Dersler*. İstanbul Üniversitesi Yayınları. No: 3773, Eczacılık fakültesi, No: 67, Emek Matbaacılık, İstanbul.
- Todd, A.R., Dekker, C. A., Michelson, A. M., 1953. Nucleotides. Part XIX. Pyrimidine deoxyribonucleoside diphosphates. *Journal of Chemistry. Soc*: 947-951.
- Topal, N., 2012. *Malatya'da yetişen kayısı meyvesi ve ekstraktlarının antioksidan kapasitesi ve oksidatif DNA hasarı üzerine etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Malatya.
- Tufan, A., 2008. *Buzağı koksidiyozisinde lipid peroksidasyon düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri* (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes üniversitesi. Veteriner İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Kayseri.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico - Biological Interactions*, **160**: 1-40.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64**: 555–559

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Van'da doğdu. İlk , Orta ve Lise eğitimimi Van'da tamamladı. Üniversite öğrenimini Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden 2003 yılında başarıyla tamamladı. 2010 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalından yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamladı. 2012 yılı Eylül ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda, öğretim görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen bu görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 02.03.2018

Tez Başlığı / Konusu: BADEM (*Amygdalus trichamygdalus*) MEYVESİNİN ANTIOKSİDANT AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA HASARI VE PROTEİN OKSİDASYONU ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

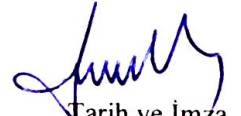
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 02.03.2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Tuncay A.intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 3 (üç) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Tarih ve İmza
02.03.2018

Adı Soyadı: İsmet MEYDAN

Öğrenci No: 149102101

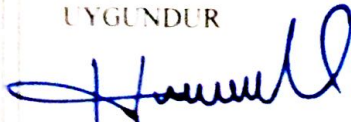
Anabilim Dalı: KİMYA

Programı: BİYOKİMYA


Statüsü: Y. Lisans

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR


Prof. Dr. Halit DEMİR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR


Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü
(Unvan, Ad Soyad, İmza)