

**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**NAR SUYU (PUNİCA GRANATUM) EKSTRAKTININ HÜCRE  
KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF  
DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Murat ÜSTÜNEL**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Nurten AKSOY**

**ŞANLIURFA**

**2013**

**T.C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**NAR SUYU (PUNİCA GRANATUM) EKSTRAKTININ**  
**HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE**  
**OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Murat ÜSTÜNEL**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Nurten AKSOY**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından  
13066 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA**

**2013**

## TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince beni her konuda bilgilendiren, deneyim ve yeteneklerinden yararlandığım değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a,

Asistanlığım boyunca bilgi ve birikimlerini içtenlikle paylaşan, yetişmemde katkıları olan değerli Tıbbi Biyokimya A.D. Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Şahbettin SELEK ve Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit'e ve aramıza yeni katılan hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice SEZEN'e ve Yrd. Doç. Dr. Emin ŞAVİK'e

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, zorlu çalışma koşullarına rağmen büyük bir özveri ve sabırla çalışan değerli Tıbbi Biyokimya A.D. Asistan arkadaşlarım Bülent ADAR, Ahmet KAYMAZ, Ali Said KADAK ve tüm Tıbbi Biyokimya çalışanları ekibine,

Tez çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı başta Biyokimya A.D. Öğretim görevlileri Hakim ÇELİK ve Abdullah TAŞKIN'a ve Uzm. Dr. Selçuk AKIN'a, Seyhan NAHYA ve Mehmet DOĞAN'a

Bilgisayar konusunda bana yardım eden Uzm. Dr. M. Akif DOKUZOĞLU'na

Kayıt yaptığım günden bitirene kadar geçen zamanda her türlü katkılarından dolayı başta Sayın Murat ALKAN ve Sayın Tevrat ZERAY olmak üzere tüm Dekanlık personeline,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana her konuda destek olan değerli aileme ve İngilizce çevirilerde bana yardımcı olan eşim Ayşe Betül ÜSTÜNEL'e ve varlığıyla hayatımıza mutluluk veren kızımız Erva Havva'ya sonsuz teşekkürler...

**Dr. Murat ÜSTÜNEL**

# İÇİNDEKİLER

# SAYFA NO

|   |      |
|---|------|
| TEŞEKKÜR  | II   |
| İÇİNDEKİLER   | III  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ   | VI   |
| TABLolar LİSTESİ  | VII  |
| KISALTMALAR ve SİMGELER                                       | VIII |
| ÖZET  | X    |
| ABSTRACT  | XII  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER   | 3    |
| 2.1 Nükleik asitler ve DNA                                    | 3    |
| 2.1.1 DNA Hasarı ve Neden olan Etkenler                       | 4    |
| 2.1.2 DNA Tamiri Önemi ve Sınıflandırması                     | 6    |
| 2.2 Genotoksisite   | 8    |
| 2.2.1 Genetoksisite Belirlemede Kullanılan Testler            | 9    |
| 2.3 Comet Assay   | 9    |
| 2.3.1 Comet Assay Tarihçesi                                   | 10   |
| 2.3.2 Comet Assay Yönteminin Avantajları ve Kullanım Alanları | 11   |
| 2.3.3 Comet Assay Tekniğini Etkileyen Faktörler               | 12   |
| 2.3.4 Comet Assay Yönteminin Başlıca Basamakları              | 12   |
| 2.4 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar                      | 14   |
| 2.4.1 Serbest Radikal Kaynakları ve Sınıflandırması           | 15   |
| 2.4.2 Reaktif Oksijen Partiküllerinin Etkileri                | 16   |
| 2.4.3 Antioksidanlar  | 18   |
| 2.4.4 Enzimatik Antioksidanlar                                | 20   |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.5 Non-Enzimatik Antioksidanlar                                    | 23 |
| 2.5 Nar   | 24 |
| 2.5.1 Nar Suyu  | 25 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM  | 26 |
| 3.1 Demirbaş Malzemeler   | 26 |
| 3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler                                      | 27 |
| 3.3 Nar Suyu Ekstraktının Elde edilmesi                               | 28 |
| 3.3.1 Nar Suyu Ekstraktının Hazırlanması                              | 28 |
| 3.3.2 Nar Suyu Ekstrakt (NSE) Konsantrasyonlarının Hazırlanması       | 28 |
| 3.4 RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması                                | 28 |
| 3.5 PBS (Fosfat) Tamponunun Hazırlanması                              | 28 |
| 3.6 Heparinize Kan Örneği Alınması                                    | 28 |
| 3.7 Mononükleer Lökositlerin Separasyonu                              | 29 |
| 3.8 Mononükleer Lökositlerin Sayımı                                   | 29 |
| 3.9 <i>In Vitro</i> Deney Ortamının Hazırlanması ve Deneyin Yapılması | 30 |
| 3.10 Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi                  | 31 |
| 3.10.1 Yöntemin Prensibi  | 31 |
| 3.10.2 Slaytların Hazırlanması  | 31 |
| 3.10.3 Lizis aşaması  | 32 |
| 3.10.4 Elektroforez tamponu   | 32 |
| 3.10.5 Elektroforezde yürütme   | 32 |
| 3.10.6 Nötralizasyon  | 32 |
| 3.10.7 Boyama   | 33 |
| 3.10.8 Oluşan DNA Hasarının Değerlendirilmesi                         | 33 |
| 3.11 Total Antioksidan Seviye   | 33 |
| 3.11.1 Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar         | 33 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.11.2 | Prensip   | 34 |
| 3.12   | Total Oksidan Seviye                                | 34 |
| 3.12.1 | Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar | 34 |
| 3.12.2 | Prensip   | 35 |
| 3.13   | Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması             | 35 |
| 4.     | BULGULAR  | 36 |
| 4.1    | Oksidatif Stres İle İlgili Bulgular                 | 36 |
| 4.2    | DNA Hasarı İle İlgili Bulgular                      | 41 |
| 5.     | TARTIŞMA  | 44 |
| 6.     | SONUÇ   | 49 |
|        | KAYNAKLAR   | 50 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1 : Nükleik Asitlerin Yapısı ve Elemanları (12)   | 3  |
| Şekil 2 : DNA molekülü (13)   | 4  |
| Şekil 3 : DNA'da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları (20)   | 5  |
| Şekil 4 : DNA tamir mekanizmaları, yaşlanma ve kanser arasındaki ilişki (24,25)   | 7  |
| Şekil 5 : Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (7)  | 8  |
| Şekil 6 : DNA'nın Comet Assay Görüntüleri (33)  | 10 |
| Şekil 7 : Alkali ve Nötral Comet Assay tekniğinin uygulama şeması (31)  | 12 |
| Şekil 8 : Lamların hazırlanması (31,35)   | 13 |
| Şekil 9 : Comet Assay tekniğinin uygulama basamakları (31,35)   | 14 |
| Şekil 10 : Oksidan Antioksidan Dengesi (37)   | 15 |
| Şekil 11 : Glutasyon Döngüsü  | 22 |
| Şekil 12 : PBS'de çözdürülen nar suyu ekstrakt konsantrasyonlarının total antioksidan seviyeleri  | 37 |
| Şekil 13 : PBS'de çözdürülen nar suyu ekstrakt konsantrasyonlarının total oksidan seviyeleri  | 38 |
| Şekil 14 : 100µg/ml,20 µg/ml,4 µg/ml,1 µg/ml NSE ve 50 µmol/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanan hücrelerin ve total antioksidan seviyeleri | 39 |
| Şekil 15 : 100µg/ml,20 µg/ml,4 µg/ml,1 µg/ml NSE ve 50 µmol/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanan hücrelerin total oksidan seviyeleri        | 40 |
| Şekil 16 : TOS ile DNA hasarı arasındaki Sperman korelasyon analizi   | 41 |
| Şekil 17 : Çalışma gruplarının örnek comet assay fotoğrafları   | 42 |
| Şekil 18 : 100µg/ml,20 µg/ml,4 µg/ml,1 µg/ml nse ve 50 µmol/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanan hücrelerin DNA hasarı                      | 43 |

## TABLolar LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 1 :</b> Comet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri (31) | 11 |
| <b>Tablo 2 :</b> Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (46)                 | 17 |
| <b>Tablo 3 :</b> Antioksidan Savunma Sistemi (48)   | 20 |
| <b>Tablo 4 :</b> PBS'de Çözdürülen NSE'nin TAS, TOS, OSİ değerleri                        | 36 |
| <b>Tablo 5 :</b> Grupların DNA Hasarı, TAS, TOS, OSİ değerleri (Mean + SD)                | 39 |



## KISALTMALAR ve SİMGELER

|               |  |
|---------------|--|
| <b>DNA</b>    | : Deoksiribonükleik Asit   |
| <b>RNA</b>    | : Ribonükleik Asit   |
| <b>UV</b>     | : Ultraviole   |
| <b>SCGE</b>   | : Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (Single Cell Gel Electrophoresis) |
| <b>BER</b>    | : Baz eksizyon tamiri  |
| <b>NER</b>    | : Nükleotid eksizyon tamiri                                      |
| <b>MER</b>    | : Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri                      |
| <b>NHEJ</b>   | : Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması                         |
| <b>HR</b>     | : Homolog Rekombinasyon  |
| <b>KA</b>     | : Kromozom Anormallikleri  |
| <b>KKD</b>    | : Kardeş kromatit değişimi                                       |
| <b>MN</b>     | : Mikronükleus   |
| <b>ROP</b>    | : Reaktif Oksijen Partikülleri                                   |
| <b>ROS</b>    | : Reaktif Oksijen Ürünleri                                       |
| <b>GSH-Px</b> | : Glutasyon Peroksidaz   |
| <b>GSH</b>    | : Redükte Glutasyon  |
| <b>GSSG</b>   | : Glutasyon Disülfid   |
| <b>SOD</b>    | : Superoksit Dismutaz  |
| <b>TAS</b>    | : Total Antioksidan Seviye                                       |
| <b>TOS</b>    | : Total Oksidan Seviye   |
| <b>OSİ</b>    | : Oksidatif Stres İndeksi  |
| <b>RPMI</b>   | : Roswell Park Memorial Institute medium                         |
| <b>PBS</b>    | : Fosfat Tamponu(Phosphate buffered saline)                      |
| <b>FBS</b>    | : Fetal Bovine Serum   |
| <b>NMP</b>    | : Normal erime noktalı (normal melting point)                    |

- LMP** : Düşük erime noktalı (low melting point)
- NSE** : Nar suyu ekstraktı
- TPT** : Standardize toplam nar tannin (standardized total pomegranate tannin) (%85 punicalagin anomerleri, %1,3 ellagik asit, %12 minör ellagitanninler, ellagik asit glikozitleri)
- ET** : Ellagitannin
- MAPK** : Mitojen ile aktive olan protein kinaz

## ÖZET

# Nar Suyu (*Punica Granatum*) Ekstraktının Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite Ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması

**Dr. Murat ÜSTÜNEL**

## Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

**Amaç:** Akdeniz havzasında birkaç bin yıldır var olan nar, Afganistan ve Pakistan'dan Himalayalar'a kadar geniş bir alanda yetişir. Nar meyvesini; kabuğu, çekirdeği ve suyu olmak üzere üç bölümde incelemek mümkündür. Nar suyu, içerdiği zengin bileşikler ve minerallerden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bu çalışmada nar suyunun, hücre kültürü ortamında mononükleer lökosit hücrelerinde genotoksisite, oksidatif durum ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin (Hidrojen peroksit) genotoksik etkisine karşı, anti-genotoksik, antioksidatif etkileri araştırılmıştır.

**Gereç ve yöntem:** *In vitro* olarak yapılan deneyde, PBS'de çözdürülen değişik konsantrasyonlardaki nar suyu ekstraktı, hücre kültürü ortamında mononükleer lökosit hücrelerine verilip 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra, hücreler yıkanıp her gruba 50µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilmiştir. Her grubun, inkübasyondan ve hidrojen peroksitten sonra, comet assay yöntemiyle genotoksisitesi ve Erel yöntemiyle oksidatif durumu araştırılmıştır. Gruplara SPSS 11.5 programı ile istatistiksel olarak non-parametrik Kruskal Wallis H ve Mann-Whitney U testleri, korelasyon analizleri için de Spearman korelasyon testi uygulanmıştır.

**Bulgular:** Total oksidan Seviyede, negatif kontrol grubu ile 100µg/ml nar suyu ekstraktı grubu, pozitif kontrol grubu ile 100µg/ml nar suyu ekstraktı + 50µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur( $p \leq 0,05$  hepsi için). Total Oksidan Seviye ile DNA hasarı arasında, Sperman korelasyon analizine göre pozitif korelasyon bulunmuştur ( $p < 0,001$ ,  $\rho: 849$ ). DNA hasarı, negatif kontrol grubu ile 100, 4 ve 1 µg/ml nar suyu ekstrakt grupları, pozitif kontrol grubu ile 100µg/ml nar suyu ekstraktı + 50µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p \leq 0.05$  hepsi için).

**Sonuç:** Çalışma Sonuçlarımıza göre, nar suyu, anti-genotoksik ve antioksidatif etkilere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı, oksidatif stresin arttığı kronik hastalıklarda, yaşlanmaya bağlı hastalıklarda ve kanser tedavisinde önleyici ve destekleyici tedaviler arasında kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Nar suyu, comet assay, genotoksisite, antioksidan, kanser

## ABSTRACT

### **Investigation of the effects of Pomegranate Juice extract on cell culture environment upon genotoxicity and oxidative status**

**Murat ÜSTÜNEL, Md**

**Specialization Thesis, Department of Medical Biochemistry**

**Purpose:** Pomegranate, that has been in Mediterranean Reservoir for ages, has been grown in a wide region from Afghanistan and Pakistan to Himalayas. It is possible to divide pomegranate into three parts as juice, seeds and peel. Pomegranate juice have been used for the treatment of several diseases due to its rich minerals and compounds for centuries. In this study, on cell culture environment, genotoxicity and oxidative status of mononuclear leukocyte cells and anti-genotoxic and antioxidative effects of pomegranate juice against genotoxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> have been researched.

**Materials and Methods:** In this *in vitro* experiment, pomegranate juice extract in different concentrations dissolved in PBS was given to mononuclear leukocytes in a cell culture environment and incubated for 30 minutes. Subsequently the cells have been washed and then 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was given to each group. After both incubation and hydrogen peroxide application of each group, genotoxicity by using comet assay and oxidative status by using Erel method have been investigated. For statistical analyses SPSS 11.5 for Windows have been used. Non-parametric Kruskal Wallis H and Mann-Whitney U tests to analyse the difference between the groups and Spearman Correlation test for correlation analysis have been used.

**Results:** There are statistically significant differences between the negative control group and 100 µg/ml Pomegranate Juice Extract group, positive control and 100 µg/ml Pomegranate Juice Extract + 50 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group in respect to total oxidant status ( $p \leq 0,05$  for all). A positive correlation between the total oxidant status and DNA damage have been

identified according to Spermian correlation analysis ( $p < 0,001$ ,  $\rho: 849$ ). DNA damage has been found as significantly different between the groups negative control group and 100, 4, 1  $\mu\text{g/ml}$  Pomegranate Juice Extract groups, positive control and 100  $\mu\text{g/ml}$  Pomegranate Juice Extract + 50 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  group ( $p \leq 0.05$  for all).

**Conclusion :** According to our findings, pomegranate juice has antigenotoxic and antioxidative effects. Because of these properties, it may be used effectively in the chronic diseases, aging-related diseases and cancer, in which oxidative stress increased as preventive and supportive therapy.

**Key Words:** Pomegranate Juice, Comet Assay, Genotoxicity, Antioxidant, Cancer

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşam, canlılık niteliği taşıyan varlıkların yaşadıkları süre boyunca kazandıkları deneyimler ve yaşayışların bütünüdür. Moleküler düzeyde bir yaşam programına ve işleyişine sahip biyolojik yapılar bütününe canlı denir. Bu yaşam programının düzgün bir biçimde çalışması haline de canlılık denir. Yaşam programının düzgün bir şekilde çalışması ve canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan maddeler nükleik asitlerdir. Nükleik asitler, bilinen yaşam formlarının tümünde bulunan nükleotid birimlerinden oluşmuş polimerlerdir. En yaygın nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır. İnsan hücresindeki bütün genetik bilgileri DNA molekülü ihtiva ettiği için hücre içinde meydana gelen bütün biyolojik olayların tek yöneticisi DNA'dır. Bu nedenle DNA molekülünde meydana gelen değişiklikler, hücre işleyişini etkileyerek yaşam programında kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Kalıcı hasarları önlemek için hücresel düzeyde DNA'yı koruyucu mekanizmalar vardır. Koruyucu mekanizmalar çok çeşitli olup bunların en önemlilerinden bir tanesi de antioksidan savunma mekanizmalarıdır.

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (1). Antioksidan maddelerin bir kısmını diyetimizde (özellikle bitki ve meyvelerden) alırken, bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Antioksidan içeriği zengin olan bitki ve meyveler, tarih boyunca çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Teknolojik gelişmeler, özellikle bitkisel ilaç araştırmalarına farklı bir boyut getirmiştir. Geliştirilen fitokimyasal ayrıştırma ve analiz teknikleri ile bitkilerin bileşimleri çözümlenmeye başlanmış, biyolojik yöntemlerdeki (mikrobiyolojik, biyokimyasal, *in vitro*, *in vivo*) gelişmeler ile bitki özütleri ve bileşenlerinin etkinliği araştırılabilmektedir. Gelişen teknoloji ile bitki ve meyvelerdeki antioksidanların, proteinlerin, moleküllerin DNA üzerine ve hücre içindeki işleyişleri üzerine çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir (2).

Epidemiyolojik çalışmalar, antioksidan bileşiklerin büyük bir kısmında anti-inflamatör, anti-aterosklerotik, anti-tümör, anti-mutagenik, anti-bakteriyel veya anti-viral aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Doğal antioksidanların vücuda alınması; kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıkların riskinin azalmasıyla doğrudan ilişkilidir (3).

Tıbbi bitkiler; çoğunluğu yüksek antioksidan aktivite gösteren polifenoller, flavonoidler, C vitamini, E vitamini ve karotenoidler (4), kinonlar, kumarinler, lignanlar, alkaloidler, aminler gibi serbest radikalleri temizleyen birçok antioksidan çeşidine sahiptir (3).

DNA ile toksik ajanların etkileşmesi sonucu genlerde ortaya çıkan ve gelecek nesillere taşınan toksisite 'genotoksisite' olarak adlandırılmaktadır (5). Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV, irradasyon), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır (6). Comet assay tekniği de genotoksisiteyi göstermede kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Son yıllarda gelişen Comet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan Comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır (7).

Bu çalışmada nar suyunun, hücre kültürü ortamında mononükleer lökosit hücrelerde genotoksisite, oksidatif durum ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin (Hidrojen peroksit) genotoksik etkisine karşı antigenotoksik, antioksidatif etkileri araştırılmıştır.

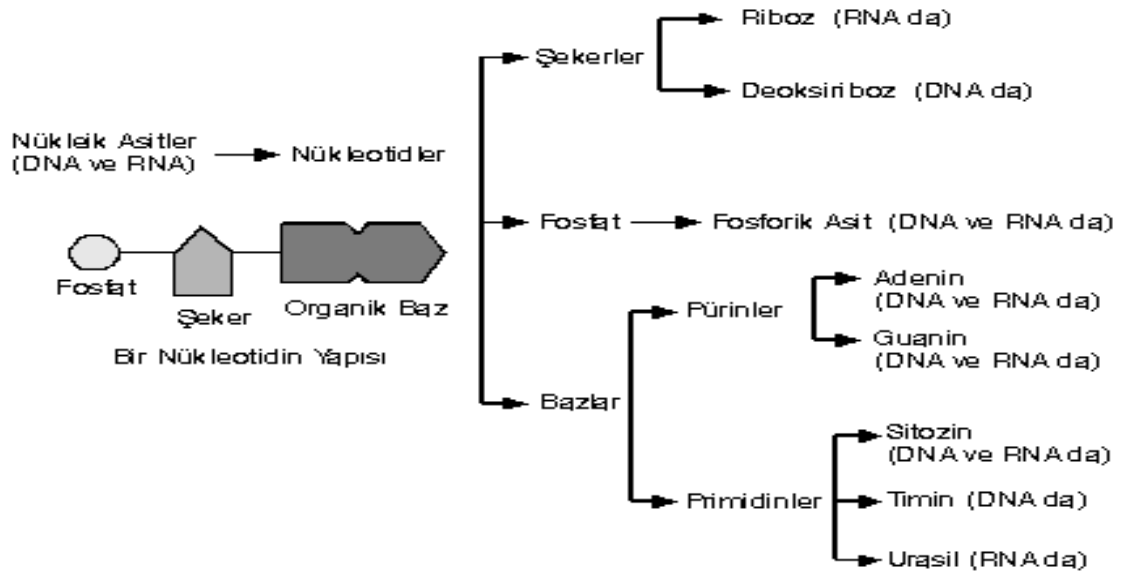


## 2. GENEL BİLGİLER

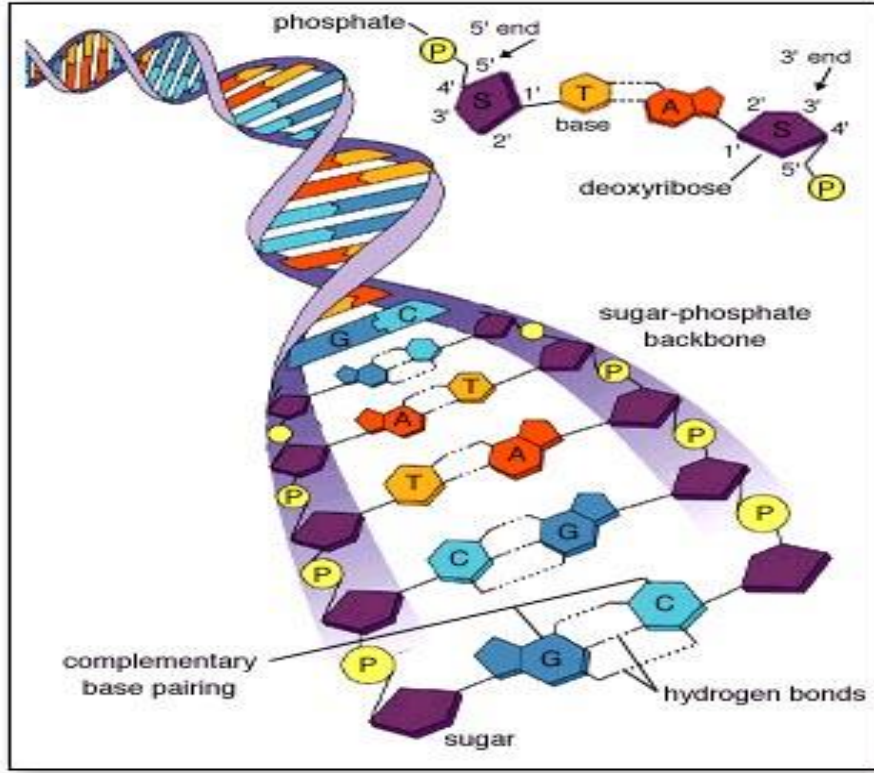
### 2.1 Nükleik asitler ve DNA

Nükleik asitler bilindiği gibi kromozomları meydana getiren genlerin yapısında yer alan ve tür özelliklerinin ebeveynden yavruya geçişinde önemli rolleri bulunan büyük molekülü kimyasal bileşiklerdir. Nükleik asitlerin iki türü mevcuttur. Bunlardan birisi DNA işaretiyle gösterilen Deoksiribonükleik asit, diğeri ise RNA harfleriyle gösterilen ribonükleik asittir. Nükleik asitler birçok nükleotid ünitelerinin meydana getirdikleri polimerlerden ibarettir(8). Kimyasal olarak DNA, nükleotid olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur(9,10). Bu polimerlerin omurgaları, ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından oluşur Merdiven basamaklarının arasında gevşek hidrojen bağlarıyla birbirini çeken pürin ve pirimidin denilen azotlu bazlar bulunur. Bu basamaklar merdivenin kenarındaki şeker moleküllerine bağlıdır. Her bir şeker grubuna baz olarak adlandırılan dört tip molekülden biri bağlıdır (11)

Azotlu baz (Purin, pirimidin) + Pentoz (Riboz, Deoksiribaz)  $\longrightarrow$  Nükleozid  
Nükleozid + Fosforik Asit  $\longrightarrow$  Nükleotid  
Nükleotid + Nükleotid + Nükleotid.....  $\longrightarrow$  Nükleik asit



Şekil 1 : Nükleik Asitlerin Yapısı ve Elemanları (12)



Şekil 2 : DNA molekülü (13)

### 2.1.1 DNA Hasarı ve Neden olan Etkenler

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır(14,15). DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır(16). Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları ekzojen veya endojen olabilir. Ekzojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötüğü sayabiliriz(17,18). DNA hasarı sadece dış faktörlerden kaynaklanmaz. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu gibi olaylar sırasında, hücre metabolizmasının yan ürün olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır(19).

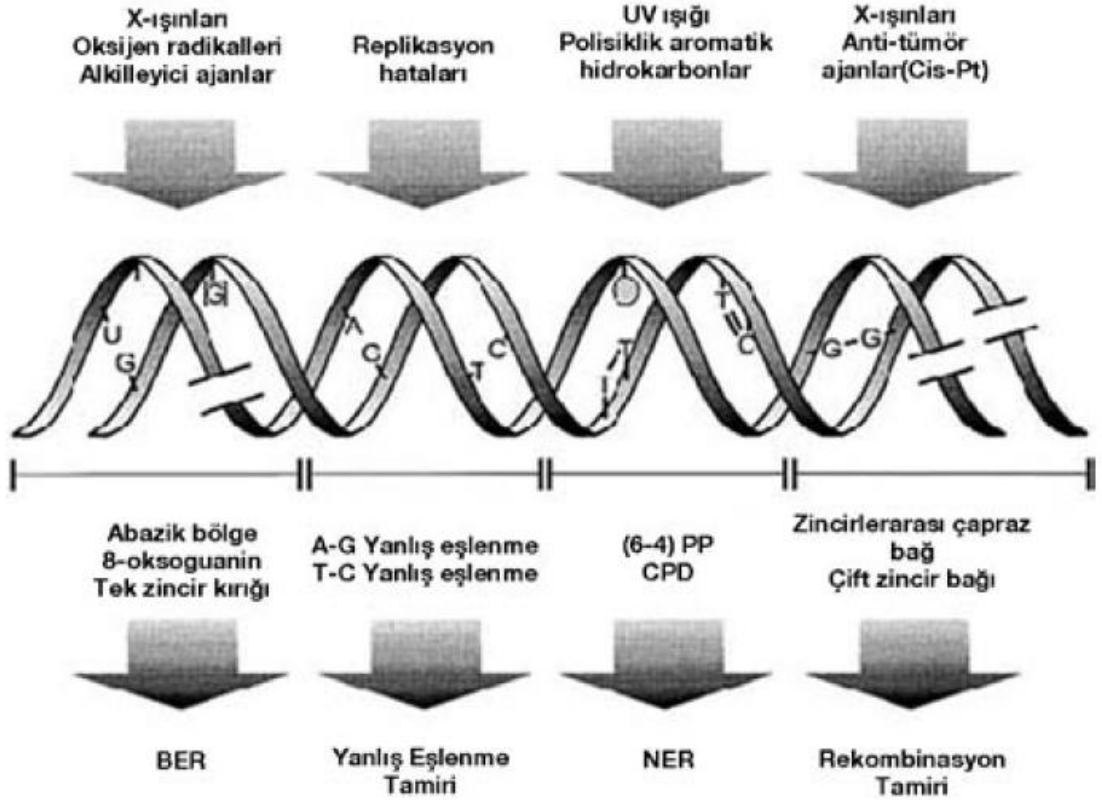
## DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

### A. Endojen (spontan) Etkenler

1. Yanlış eşleşmeler: İnsersiyon/delesyonlar
2. Kimyasal değişiklikler: Deaminasyon, metilasyon
3. Baz kayıpları: Depurinasyon/depirimidinasyon
4. Oksidatif Hasar: 100.000 /hücre/gün
5. Replikasyon hataları

### B. Ekzojen (Çevresel) Etkenler

1. Kimyasal ajanlar: Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları v.b
2. Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon v.b. (19)



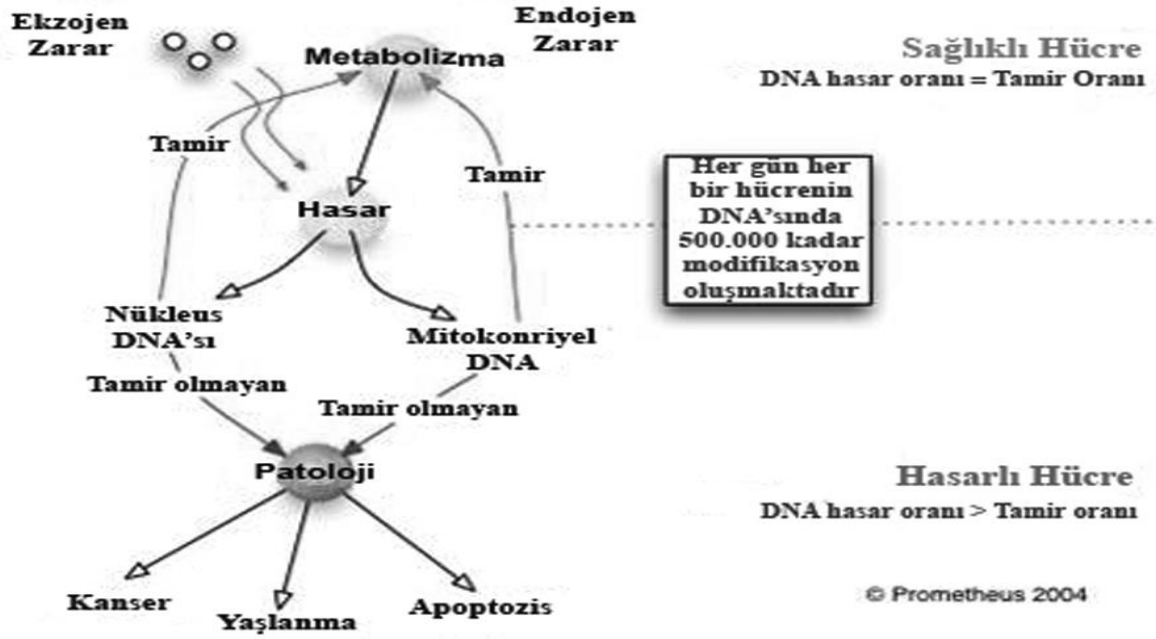
Şekil 3 : DNA'da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları (20)

Hücrede DNA hasarına karşı dört önemli yanıt oluşur:

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması [DNA onarımı],
2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin tamirine imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi [transkripsiyonel cevap],
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi [programlı hücre ölümü, apoptoz] (15,21).  
Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (15,21,22).

### **2.1.2 DNA Tamiri Önemi ve Sınıflandırması**

İnsan hücreleri DNA hasarını onarabilme yeteneğine sahiptirler (23). DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (11). DNA tamir mekanizmalarında deneysel olarak genetik defektler oluşturulan deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda yaşam süresi azalırken, kanser gibi hastalıkların arttığı gözlenmiştir. Bu durum DNA tamir mekanizmaları, yaşlanma ve kanser arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu önermektedir (24).



Şekil 4 : DNA tamir mekanizmaları, yaşlanma ve kanser arasındaki ilişki (24,25)

### DNA Tamir Mekanizmaları

#### 1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)

A- Fotoreaktivasyon

B- O6-metilguanin tamiri

C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

#### 2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

A-Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

#### 3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

#### 4. SOS Tamiri

#### 5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

A- Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması ( NHEJ )

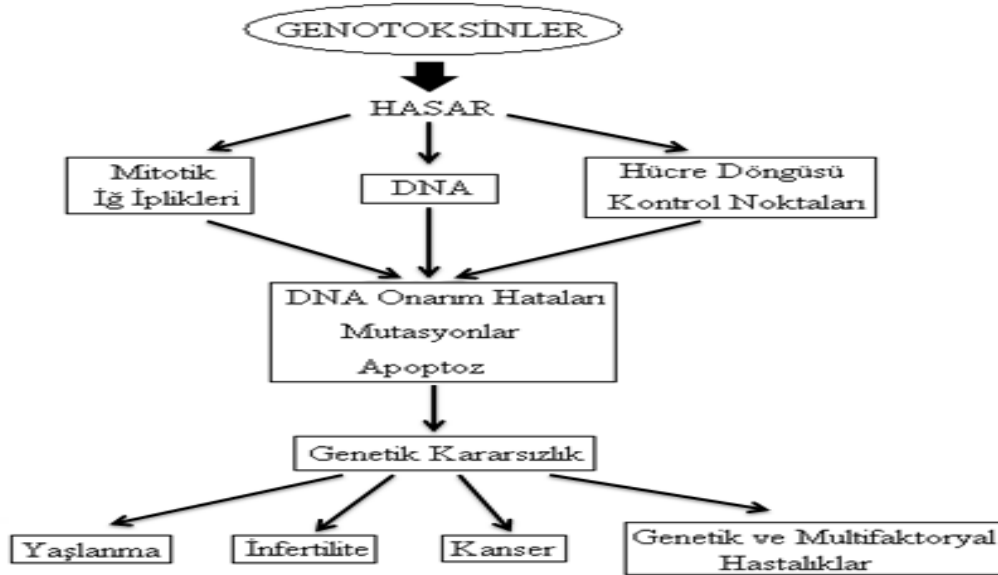
B- Homolog Rekombinasyon ( HR )(11)

DNA tamir mekanizmalarınız ne kadar güçlüyse o kadar uzun yaşarsınız! Bir başka deyişle, sizin gelecekteki DNA hasar tamir işlevleri ile ilgili her enziminizin yeteneği, annenizin ve babanızın birbirlerini seçtiği gün belirlenmektedir. Hastalıklara olan yatkınlıklarınız da böyle belirlenmektedir. Uzun ömürlü canlı türleri en etkin DNA tamir mekanizmasına sahip olanlardır (24).

## 2.2 Genotoksisite

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidide gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (7,26,27).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (7).



Şekil 5 : Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (7)

Bazı genotoksik ajanlar sadece genomun bütünlüğüne zarar vermez aynı zamanda DNA'nın ifadesini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilir. Bu etkiler farklı tipteki tümörlerin oranında bir artışa neden olabilir. Uzun dönemli etkileşim sonucu ise maruz bırakılan popülasyonların genetik değişkenliğinde bir alterasyona sebep olabilir. Bu gerçekler genotoksisiteyi incelemek için hızlı görüntüleme testlerinin oluşturulmasını zorunlu kılar (28,29).

### **2.2.1 Genetoksisite Belirlemede Kullanılan Testler**

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar (7).

Genetik sistemler ile genotoksisite test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri(KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (7).

### **2.3 Comet Assay**

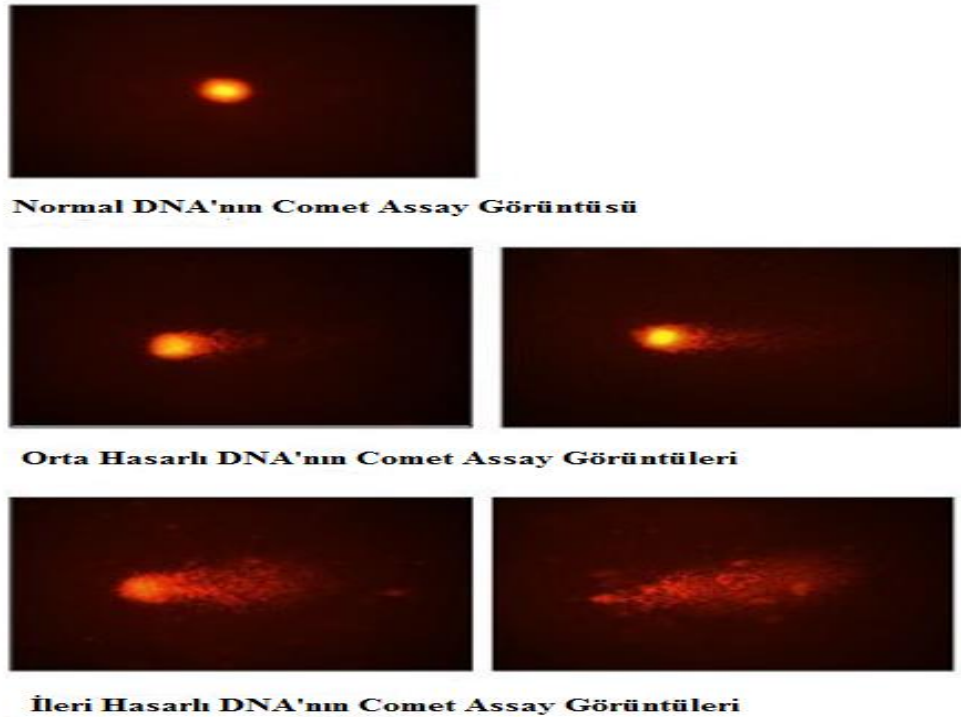
Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottür (30). Kıvrık DNA'nın alkali elektroforez sırasında hücre dışına çıkması ile DNA hasarını yansıtan kuyruklu yıldız görüntüsünden adını alan SCGE floresan mikroskopik bir yöntemdir (6).

Comet Assay tekniğinin genel olarak 2 ayrı amaca yönelik farklı uygulaması vardır. Teknik alkali koşullar altında veya nötral koşullar altında uygulanabilir. DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine yönelik çalışmalarda nötral çalışma koşulları uygulanırken, tek sarmal kırılmaların belirlenmesine yönelik çalışmalarda alkali koşullar uygulanmaktadır (31).

### 2.3.1 Comet Assay Tarihçesi

İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydenberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agaroz'a gömülmüş olan hücreleri "lizize" ederek hücreleri proteinlerden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akrinin oranj ile DNA'yı boyamışlar ve kırmızı flörosana yeşilin oranını hesaplamışlardır. Kırmızı flörosans tek sarmalı, yeşil flörosans ise çift sarmalı göstermiştir. Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (32).

Daha sonra aynı laboratuvarda Östling ve Johanson tarafından 1984 yılında izole edilmiş hücrelerde DNA hasarını ölçmek için "Mikrojel Elektforez Tekniği" adı altında bir teknik geliştirilmiştir. Bu teknikte hücreler mikroskop lamında agarosa gömüldükten sonra deterjan ve tuz ile lizize edilmiş ve DNA nötral şartlarda elektforeze tabi tutulmuştur. Elektforez işlemi düşük elektrik akımında (5V/cm) 5 dakika süreyle yapılmış ve daha sonra lamlar akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyanmıştır. Elektrik akımı sonucunda hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru sürüklenmiş ve baş ve kuyruğu ile bir kuyruklu yıldız (comet) görüntüsünün oluşmasına neden olmuştur (31).



Şekil 6 : DNA'nın Comet Assay Görüntüleri (33)



Ostling ve Johanson'un geliştirdikleri teknikte kullanılan liziz şartları nötral pH'da olduğu için DNA baz çiftleri ayrılamadığından sadece çift DNA sarmal kırıklarının tayini mümkündür. Teknik daha sonra Singh ve arkadaşları tarafından liziz işlemleri alkali koşullarda yapılarak modifiye edilmiş ve sadece sarmal kırıklarının değil alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların (alkali labile sites), DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine olanak sağlamıştır. Singh ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntem, günümüzde bazı basamaklarda yapılan değişikliklerle beraber en çok kullanılan yöntemdir (31).

| pH:7-8                                  | pH:10-12   | Ph:>13  |
|---|--|---|
| Çift Sarmal Kırıkları<br>Çapraz bağları | Çift Sarmal Kırıkları<br>Tek Sarmal Kırıkları<br>Eksizyon Tamir Bölgeleri<br>Çapraz Bağlar | Çift Sarmal Kırıkları<br>Tek Sarmal Kırıkları<br>Eksizyon Tamir Bölgeleri<br>Çapraz Bağlar<br>Alkali Ortamda Açığa Çıkan Hasarlar |

**Tablo 1 :** Comet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri (31)

### 2.3.2 Comet Assay Yönteminin Avantajları ve Kullanım Alanları

SCGE yöntemi düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, fazla ekipman gerektirmemesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre ve doku grupları ile çalışılabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilip ve değerlendirilmesi, güvenli ve ekonomik olması nedeniyle giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmaktadır(32).

Comet Assay yönteminin uygulama alanlarını ana başlıklar altında şöyle sıralayabiliriz(31).

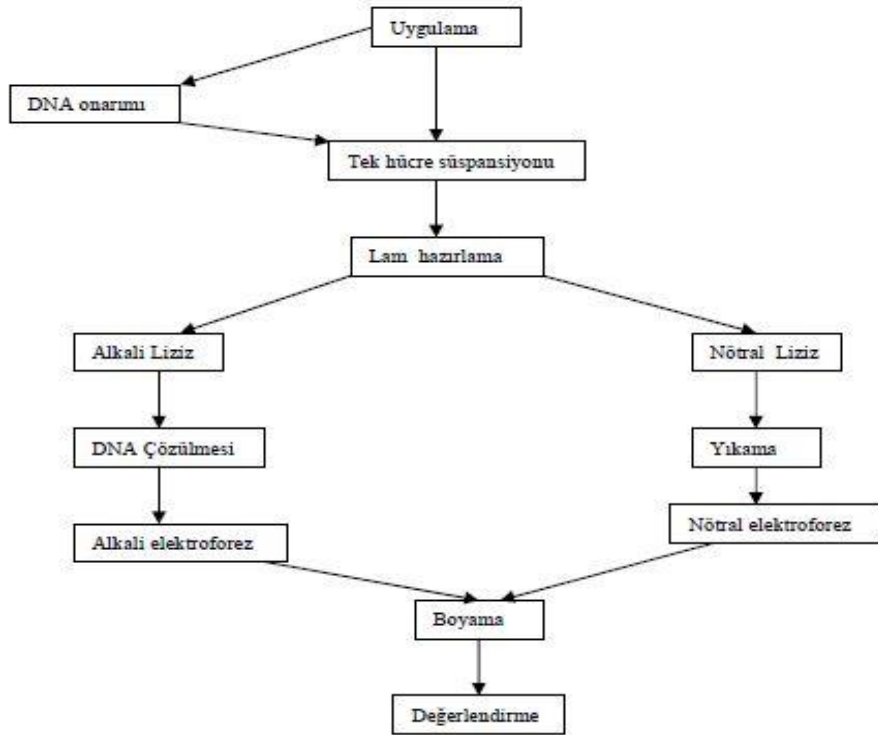
- Genotoksisite üzerine çalışmalar
- Klinik Çalışmalar
- DNA onarımı üzerine çalışmalar
- Çevresel Biyoizleme
- İnsan Biyoizlemesi
- Comet Assay tekniğinin gıdalarda uygulaması

### 2.3.3 Comet Assay Tekniğini Etkileyen Faktörler

SCGE tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), liziz solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Ayrıca insana yönelik çalışmalarda genotoksik etkiyi potansiyelize ettiği tartışılan faktörler SCGE tekniği de etkileyebilir (34).

### 2.3.4 Comet Assay Yönteminin Başlıca Basamakları

Comet Assay tekniğinin uygulamasında amaca göre 2 farklı yöntem izlenebilir. Aşağıda Şekil 7’de alkali ve nötral Comet Assay tekniğinin ana basamakları gösterilmiştir



Şekil 7 : Alkali ve Nötral Comet Assay tekniğinin uygulama şeması (31)

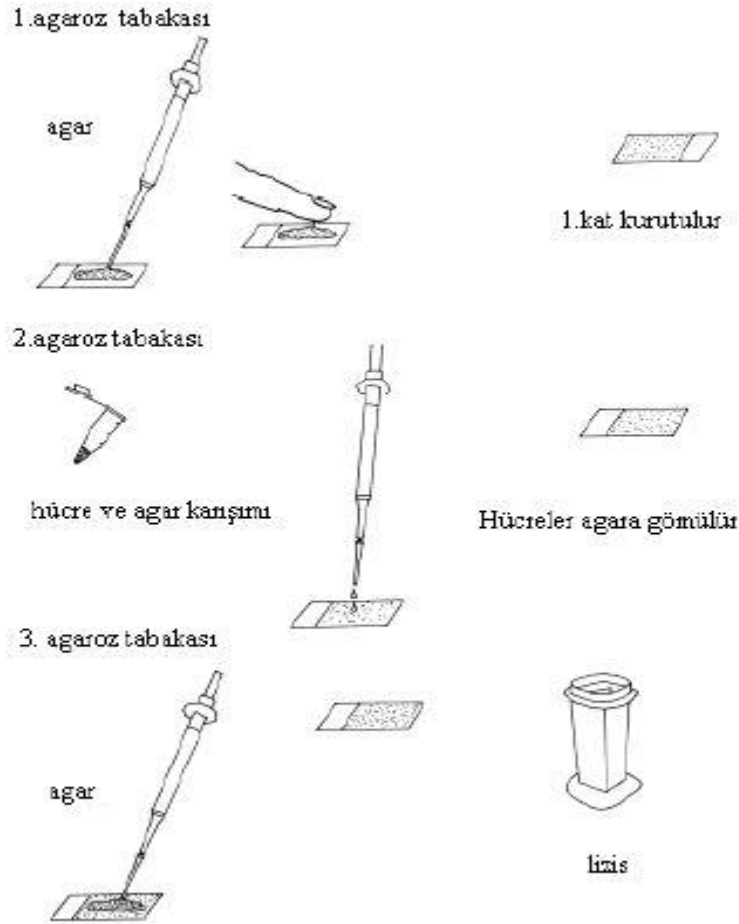
Comet Assay tekniğinde izlenecek ana aşamalar şunlardır (31):

- Hücre süspansiyonlarının hazırlanması

- Lamların hazırlanması
- Hücre parçalanması (Liziz)
- Elektroforez
- Nötralizasyon
- Boyama
- Lamların değerlendirilmesi

Ancak çalışmanın amacına göre tekniğin uygulamasında bazı değişikliklerin, modifikasyonların yapılması mümkündür (31).

Comet Assay tekniğinin lam hazırlama basamağı kısaca temsili olarak Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8 : Lamların hazırlanması (31,35)

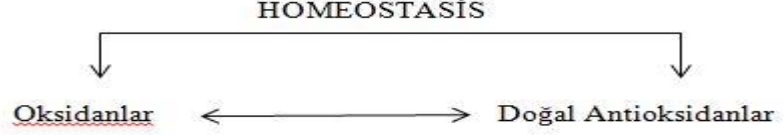
Comet Assay tekniğinin uygulama basamakları kısaca Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9 : Comet Assay tekniğinin uygulama basamakları (31,35)

## 2.4 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denmektedir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (1). Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (36).



Şekil 10 : Oksidan Antioksidan Dengesi (37)

#### 2.4.1 Serbest Radikal Kaynakları ve Sınıflandırması

Organizmada pek çok türde ROP (Reaktif Oksijen Partikülleri) oluşabilir (1). Hücrelerdeki serbest radikal üretiminin başlıca kaynağı, mitokondriyal elektron transport zincirinden elektronların sızmasıdır (38,39). Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROP'lar oluşur. Aşağıda ROP'ların *in vivo* ortamda kaynakları görülmektedir (1,40).

#### Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları:

##### I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

##### II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
  - a-) İnhale edilenler
  - b-) Alışkanlık yapan maddeler
  - c-) ilaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
  - a-) Ksantin oksidaz
  - b-) İndolamin dioksigenaz
  - c-) Triptofan dioksigenaz

d-) Galaktoz oksidaz

e-) Siklooksigenaz

f-) Lipooksigenaz

g-) Monoamino oksidaz

4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma

(nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

### **III-Yaşlanma Süreci**

ROP'lerini aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (1).

#### **Reaktif Oksijen Partikülleri:**

1 - Radikaller:

- Süperoksit radikal (  $O_2^-$  )
- Hidroksil radikal (  $OH^-$  )
- Alkoksil radikal (  $LO^-$  )
- Peroksil radikal (  $LOO^-$  )

2 - Radikal olmayanlar:

- Hidrojen peroksit (  $H_2O_2$  )
- Lipid hidroperoksit (  $LOOH$  )
- Hipoklorik asit (  $HOC1$  )

3 - Singlet oksijen

#### **2.4.2 Reaktif Oksijen Partiküllerinin Etkileri**

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani

sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar (41).

Laboratuvar hayvanlarında ortalama ömür ve maksimum yaşam süresini artırmanın en güvenilir yolu kalori kısıtlaması yapmak yani; esansiyel gıda ve mineralleri kısıtlamadan gıda girişini azaltmaktır (42,43). Kalorisi kısıtlanmış hayvanların dokularında lipid, protein ve DNA gibi makro moleküller üzerine serbest radikal hasarı, mitokondriyal  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  üretim oranı, ad libitum beslenen hayvanlarla karşılaştırıldığında daha düşüktür (42,44,45).

| Etkilenen Bileşik                                      | Sonuçlar   |
|--|--|
| 1. Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler | a) Protein denatürasyonu<br>b) Çapraz bağlanma<br>c) Enzim inhibisyonu<br>d) Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler |
| 2. Nükleik asit bazları                                | a) Hücre gelişiminde değişimler<br>b) Mutasyon   |
| 3. Karbohidratlar                                      | a) Hücre yüzey reseptörlerinde değişim   |
| 4. Doymamış lipitler                                   | a) Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu   |
| 5. Kofaktörler   | a) Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma<br>b) Askorbat ve porfirin oksidasyon                |
| 6. Antioksidanlar                                      | a) a-tokoferol ve $\gamma$ -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması  |
| 7. Proteinler  | a) Denatürasyon<br>b) Peptit zincirinde kırılmalar   |
| 8. DNA   | a) Baz modifikasyonları<br>b) Zincirde kırılmalar  |
| 9. Hyaluronik asit                                     | a) Synovial sıvının vizkozitesinde değişim   |

**Tablo 2 :** Hücresele serbest radikallerin etkilediği moleküller (46)

Çoğu hastalıklarda artmış ROP hastalığının sebebi değildir, primer bozukluğa ikincil olarak oluşurlar ve ardından patogeneizde yer alırlar. Aşağıda ROP' ların ilgili olduğu klinik durumlar özetlenmiştir (40,41,47).

### **Reaktif Oksijen Partikülleriyle İlişkili Hastalıklar**

## **1- Multi-organ Tutulumu:**

- İnflamatuvar - İmmun hasar: Glomerulonefrit, vaskülitler, sepsis
- İskemi - reperfüzyon hasarı
- İlaç ve toksinlerle oluşan hasarlanma
- Demir depolanması: Hemokromatoz, Talasemi
- Nutrisyonel faktörler: Kwashiorkor, E vitamini eksikliği
- Alkol
- Radyasyon hasarı
- Kanser
- Amiloidoz

## **2- Tek Organ Tutulumu:**

- Eritrositler: Fenilhidrazin, primakin, kurşun zehirlenmesi, orak hücreli anemi
- Akciğer: Sigara içilmesi, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, erişkin tip solunumsal yetmezlik sendromu, bleomisin toksisitesi
- Kardiyovasküler sistem: Ateroskleroz, doksorubisin toksisitesi, alkol kardiyomyopatisi
- Böbrek: Antiglomeruler bazal membran hastalığı, aminoglikozid nefrotoksisitesi, renal greft rejeksiyonu
- Gastrointestinal sistem: Endotoksin ve karbontetraklorür ile karaciğer hasarı, pankreatit, stress ülseri, inflamatuvar bağırsak hastalıkları
- Eklemler: Romatoid artrit
- Beyin: Hiperbarik oksijen, nörotoksinler, senil demans, parkinson, serebral travma, demyelinizan hastalıklar, alüminyum birikimi
- Göz: Katarakt, hemorajiler, dejeneratif retinal hasar
- Deri: Solar radyasyon, termal hasar, porfiri, kontakt

### **2.4.3 Antioksidanlar**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya



antioksidan savunma denir (1). Antioksidanlar hücrelere saldırmadan serbest radikalleri stabilize ve deaktive etme yeteneğinde olan moleküllerdir (48). İyi bir antioksidan; serbest radikallerin etkinliğini spesifik olarak ortadan kaldırabilmeli, redoks metalleriyle şelat yapabilmeli, antioksidan ağındaki diğer antioksidanlarla ilişkide bulunarak onları rejenere edebilmeli, gen ekspresyonu üzerine pozitif etkilere sahip olmalı, kolayca absorbe olabilmeli, doku ve vücut sıvılarında uygun fizyolojik seviyelerde bulunmalı, hem sıvı ortamlarda hem membranlarda fonksiyone edebilmelidir (48,49). Organizmalara karşı oksidatif stres tehdidi o kadar büyüktür ki; hücrelerde serbest radikal yıkımına karşı bir antioksidan savunma ordusu ve onarıcı sistemler gelişmiştir (42).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (36,50);

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

Oksidatif strese karşı vücudumuz ya ROS üretimini engelleyerek ya ROS düzeyini azaltarak ya da ROS tarafından hasarlanan proteinleri onararak veya elimine ederek karşı koymaya çalışır. Bu savunma mekanizmalarından ROS düzeyini azaltmaya yönelik olan antioksidanları 3 grupta toplayabiliriz (Tablo-3)(48,51–54).

| Antioksidan Savunma Sistemi   |   |
|---|---|
| 1) ROS'u daha az toksik ürünlere dönüştüren detoksifiye edici enzim sistemleri (Enzimatik antioksidanlar)   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Katalaz</li> <li>• Superoksid Dismutaz</li> <li>• Glutatyon redoks siklus enzimleri [glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz]</li> </ul> |   |
| 2) Radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidanlar (Nonenzimatik antioksidanlar)  |   |
| -Endojen  | Diyetle alınan  |
| -Bilirubin  | - $\alpha$ Tokoferol (E vit)                            |
| -Tioller [lipoik asid, N-asetil sistein indirgenmiş glutatyon (GSH)]  | - Askorbik asit (C vit)                                 |
| - NADPH,NADH  | - $\beta$ karoten (provit A)                            |
| -Ubiquinon(koenzimQ10)  | -Diğer karotenoid ve oksikarotenoidler(likopen, lutein) |
| -Ürik asit  | -Polifenoller   |
| 3) ROS oluşumunu önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen sistemler (metal bağlayan proteinler: ferritin, laktoferrin, seruloplazmin) (mitokondriyal sitokrom oksidaz)  |   |

**Tablo 3 :** Antioksidan Savunma Sistemi (48)

#### 2.4.4 Enzimatik Antioksidanlar

Oksidatif toksik ara ürünleri metabolize ederler. Sinerjik çalışırlar(48).

- **Superoksid Dismutaz**

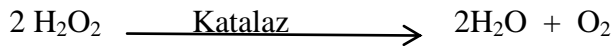
Süperoksit dismutaz (EC, 1.15.1.1) 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (55,56).



İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir (55,57). Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder(55).

- **Katalaz**

Katalaz (EC, 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak; bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (55,58).



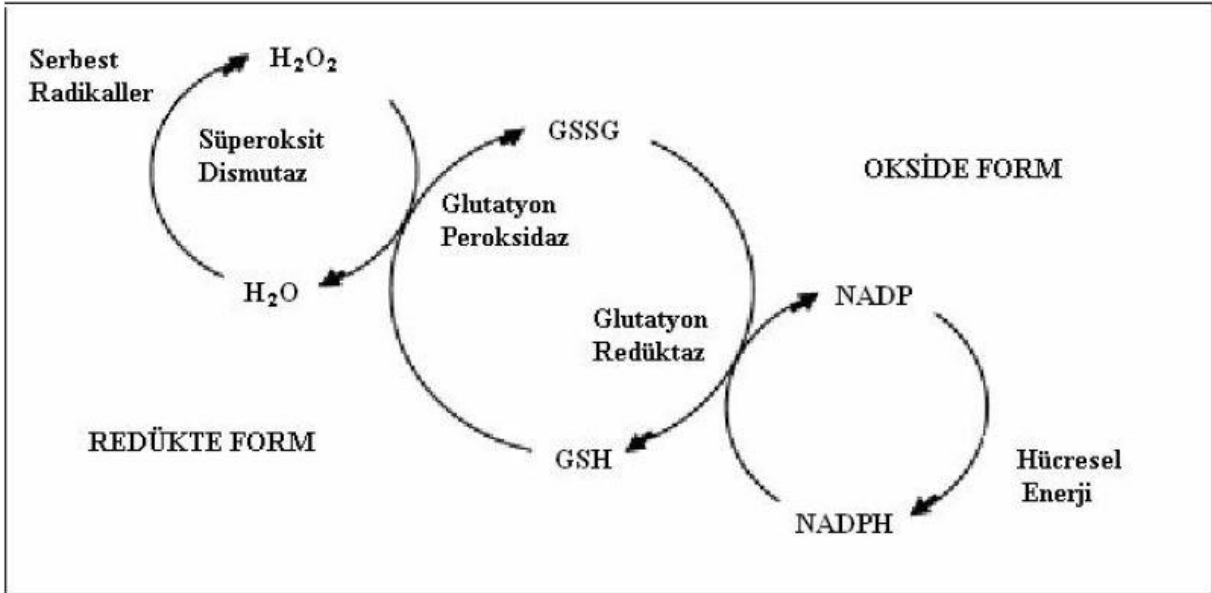
Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez (55,59).

SOD ve katalazın ilk reaktif ürünler olan süperoksit radikal ve hidrojen peroksidi katalize edici etkileri nedeniyle teorik olarak antioksidan etkilerinin diğer antioksidanlara göre avantajlı olabileceği düşünülmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı olan enzimatik antioksidanlar sindirim sisteminden değişmeden emilirlerse etkin olabilirler. SOD ve katalaz hem bitkisel hem hayvansal ürünlerde bulunmaktadır. Bu iki antioksidanın aktivitesini gösteren 30 kadar botanik ekstre çalışılmış ve bu ekstrelerle yapılan bazı çalışmalarda antioksidan etkileri (lipid peroksidasyon ürünlerinde azalma), stres azaltıcı etkileri gösterilmiştir (48,60–62).

- **Glutasyon Peroksidaz ve Glutasyon Redüktaz**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC, 1.11.1.9), glutasyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimdir (36,63,64).

Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız 2 izomeri bulunmaktadır. Selenyuma bağlı izoenzimi selenosistein formunda bulunmaktadır. Bu enzim hem hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri (örneğin, kümen hidroperoksit) kullanabilir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px ise, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup, yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir (36,64,65).



Şekil 11 : Glutasyon Döngüsü

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suya indirgenirken redükte Glutasyon (GSH), glutasyon disülfide (GSSG) yükseltgenir. Antioksidan savunma sistemini normal işleyişi sırasında indirgenmiş Glutasyon, hidrojen peroksiti GSH-Px ile detoksifiye eder. Ayrıca Glutasyon redüktazda, hidrojen peroksiti redükte Glutasyon'a (GSH) dönüştürerek hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna katkıda bulunmasından dolayı önemlidir(36,64,66).

Glutasyon redüktaz (GSH-R, EC, 1.8.1.7) oksitlenmiş NADPH'nin elektronunu kullanarak GSSG'yi, redükte glutasyon'a (GSH) çevirir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin detoksifikasyonunun devamı için NADPH'nin sağlanması gereklidir (36,64,66).

### 2.4.5 Non-Enzimatik Antioksidanlar

Düşük molekül ağırlıklı olan bu antioksidanlar okside olarak başka bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktirir veya önlerler. Bunların bir kısmı endojendir (lipoik asit, glutatyon, koenzim Q 10 gibi). Bir kısmı diyetle alınır ( $\alpha$  tokoferol, askorbik asit, karotenoidler, polifenoller gibi) (48,52,67).

- **Lipoik Asit**

Hem suda hem yağda çözünür. Prooksidan metallerle şelat yaparak antioksidan etkisini gösterir. Lipoik asit ve Q enzimle ilgili çalışmalar daha çok kardiyovasküler sistem koruyuculuklarıyla ilgilidir (51).

- **Koenzim Q-10**

Endojen sentezlenen yağda çözünen tüm membranlarda bulunan bir antioksidandır. E vitamini ile sinerjistik çalışır (52).

- **Glutatyon**

Suda çözünen bir antioksidandır. Glutamate, sistein ve glisinden (gama-glutamil sisteinil glisin) oluşur. Ksenobiyotik metabolizmada önemlidir. C vitamini ile sinerjik çalışır(51). Oral yoldan verilmesinin kan seviyesini etkilemediği gösterilmiştir (68). Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutatyon'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutatyon, HO<sup>•</sup> ve O<sub>2</sub><sup>↑↓</sup> gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Demirin Fe<sup>+2</sup> (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenere olmalarını sağlar. N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek glutatyon üretimini artırır (69).

- **Vitamin C**

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vit'i, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vit'in antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü, vitamin C,  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücrenel ajandır. Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda  $H_2O_2$  ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Bu prooksidan etki sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (69–71)

- **Vitamin E (Tokoferol)**

E vitamininin önemli bir özelliği; antioksidan etkinliğinin olması nedeniyle peroksitleri ve oksijen radikallerini nötralize etmesidir (72,73). Yani oksijeni bağlayarak, oksijen etkisi ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin önüne geçer. Hücrelerde doymamış yağ asitleri (linoleik asit ve araşidonik asit gibi) kendiliğinden veya oksidan metabolitlerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilirler. Böylece lipit peroksidasyonuna veya protein ve yağlara kovalent bağlanarak membran hasarına neden olurlar (72,74). Serbest oksijen radikalleri oluşmasının eşlik ettiği bu olay zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan E vitamindir. Diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutasyon, peroksidaz ve beta karoten gibi) E vitamini kadar etkili değildir (72).

## 2.5 Nar

Nar (*Punica granatum*) Punicaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir. Genellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetiştirilmektedir (75,76). Nar, bilinen en eski meyve türlerinden biridir, kaynaklarda, 6500 yıldır insanoğlunun bildiği, yediği ve şifa kaynağı kabul ettiği yazılmaktadır. Adına rastladığımız ilk yazılı kaynaklar ise, M.Ö. 1550 yıllarında yazıldığı tahmin edilen ve Mısır'da bulunan Ebers Tıp Papirüsüdür. Türkçede kullanılan "nar" kelimesi Farsça'dan dilimize geçmiştir. Latince ismi ise *Punica granatum*'dur. Nar'ın anavatanının İran, Hindistan ve Pakistan olduğu bildirilmektedir. Günümüzde İran başta olmak üzere Çin ve Hindistan'da yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye, nar üretimi bakımından 4. sırada yer almaktadır. Pakistan, Azerbaycan ve İspanya ise diğer önemli üretici ülkelerdir. Narın yüksek adaptasyon kabiliyeti, dikildikten 3-4 yıl sonra meyve vermeye başlaması, ağacının ve meyvesinin dayanıklılığı ve meyvesinin yararlarının yeniden

keşfedilmesiyle üretimi gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Nar, halen bütün Akdeniz ülkelerinde, Ortadoğu ülkelerinde, Kırım'dan başlayıp Azerbaycan'a, Çin'e kadar uzanan Asya ülkelerinde ve ABD ile Güney Amerika ülkelerinin bir kısmında üretilmektedir (75).

Türkiye'de nar üretiminin % 61,8'i Akdeniz, % 23,3'ü Ege ve % 9,1'i de Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılmaktadır. En fazla nar üretilen ilimiz ise Antalya'dır (75).

Narın, rengi açık pembeden koyu kırmızıya, tadı tatlıdan ekşiye değişen 50 kadar çeşidi vardır. Çeşide bağlı olarak kabuk oranı ve tane oranı değişmektedir. Meyve suyu randımanı da çeşide göre farklılık göstermektedir(75).

### **2.5.1 Nar Suyu**

Nar suyunun delfinidin, siyanidin, pelargonidin gibi antosiyaninlerden ve punicalin, ellagatinler ve ellajik asitten dolayı yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir (75,77). Birçok araştırmada nar ve nardan elde edilen yan ürünlerin güçlü bir serbest radikal süpürücü ve etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir(78–81). Nar suyunun gramında yaklaşık 63 mikrogram antioksidan polifenol bileşiği bulunur (78,82). Nar suyunda bol miktarda bulunan tanin (punicalin ve punicalagin) ve antosiyaninler gibi polifenolik flavanoid antioksidanlar molar bazda; vitamin C, E, koenzim Q–10 ve alfalipoik asit gibi birçok maddeden daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir, Aynı zamanda nar suyu diğer tüm meyvelerden ve kırmızı şaraptan daha fazla antioksidan aktiviteye sahiptir, Nar suyundaki antioksidan maddelerin sadece *in vitro* ortamda değil aynı zamanda *in vivo* ortamda da olumlu antioksidan özellikleri gösterilmiştir (78,83,84).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Demirbaş Malzemeler

Kullanılan demirbaş malzeme listesi şöyledir:

1. Laminar Flow Güvenlik Kabini (Heraeus<sup>®</sup>)
2. CO<sub>2</sub> inkübatörü (%5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ve 37°C) (LaboTect<sup>®</sup>)
3. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 30 RF<sup>®</sup>)
4. Otoanalizör (Abbott<sup>®</sup>)
5. Floresan invert mikroskop (Olympus<sup>®</sup>)
6. Işık mikroskobu (Olympus CK X41<sup>®</sup>)
7. Dijital Fotoğraf Makinesi (Olympus C 5050 Z<sup>®</sup>)
8. ±4°C Buzdolabı (Profilo<sup>®</sup>)
9. -20°C derin dondurucu (New Brunswick Scientifi<sup>®</sup>, C54285 model)
10. -80°C derin dondurucu (Revco<sup>®</sup>)
11. Freeze dryer (Shin<sup>®</sup>)
12. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag<sup>®</sup>)
13. Vorteks (Nüve<sup>®</sup>, NM 110 model, Türkiye)
14. Pipet pompası (Boeco<sup>®</sup>)
15. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson<sup>®</sup>)
16. Hassas Terazı (Sartorius<sup>®</sup> marka 0,0001 g'a duyarlı)
17. Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF<sup>®</sup>)
18. Distile Su Cihazı (Nüve<sup>®</sup>)
19. Elektroforez (Biolab Midi Cell<sup>®</sup>)
20. Hot plate (Thermolyne<sup>®</sup>)
21. Vortex (Nüve<sup>®</sup>)
22. Manyetik karıştırıcı
23. Su banyosu (Nüve<sup>®</sup>, BM 402 model, Türkiye)
24. pH metre (Hanna<sup>®</sup>, pH 211 model Japon)
25. İmmersiyon Yağı (Merck<sup>®</sup>)



26. Lam (Isolab<sup>®</sup>)
27. Plastik Pastör Pipet (Isolab<sup>®</sup>)
28. Pipet ucu (Beyaz, 0.1-10 µL)
29. Pipet ucu (Sarı, 1-200 µL)
30. Pipet ucu (Mavi, 100-1000 µL)
31. Kurutma Kağıdı
32. Cam Malzemeler (Mezür, Beher, Erlen, Şale)
33. Eppendorf Tüpü

### 3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hücre kültürü ortamını hazırlama, deney ve elektroforez işlemi sırasında kullanılan kimyasal maddeler aşağıda liste halinde verilmiştir.

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65 0C) agaroz jel (Sigma<sup>®</sup>)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37 0C) agaroz jel (Sigma<sup>®</sup>)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba<sup>®</sup>)
4. Sodyum klorür (Merck<sup>®</sup>)
5. Potasyum Klorür (KCl) (Merck<sup>®</sup>)
6. Tris base (Sigma<sup>®</sup>)
7. Triton X-100 (Sigma<sup>®</sup>)
8. Sodyum hidroksid (Merck<sup>®</sup>)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck<sup>®</sup>)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck<sup>®</sup>)
11. Etidyum bromit (Sigma<sup>®</sup>)
12. Hidrojen peroksit (Merck<sup>®</sup>)
13. Tris HCl (Sigma<sup>®</sup>)
14. Histopaque-1077 (Sigma<sup>®</sup>)
15. Giemza boyası (Merck<sup>®</sup>)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba<sup>®</sup>)
17. RPMI 1640,(Lonza<sup>®</sup>)

### **3.3 Nar Suyu Ekstraktının Elde edilmesi**

Nar meyvesi Şanlıurfa'nın Karaköprü semtinden manavdan satın alınarak elde edilmiştir.

#### **3.3.1 Nar Suyu Ekstraktının Hazırlanması**

Narın taneleri, nar kabuğundan ayrıldıktan sonra 3 katlı gazlı bez yardımıyla narın taneleri sıkılarak nar suyu elde edilmiştir. Elde edilen nar suyu whatman no:1 kağıdından geçirilmiştir. Daha sonra 2000 rpm'de on dk. santrifüj edilip supernatantı alınmıştır. Supernatant çözeltisi şişelere aktararak  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buz haline getirilerek Shin marka liyofilizatör (freeze drier) cihazında  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kuru ekstraktı elde edilmiştir. Kuru ekstrakt hücre kültür ortamına verilmek üzere  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depo edildi.

#### **3.3.2 Nar Suyu Ekstrakt (NSE) Konsantrasyonlarının Hazırlanması**

Elde edilen Nar suyu kuru ekstraktları, PBS ortamında çözdürülerek hücre kültürü ortamında son konsantrasyonları 100  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde hazırlandı.

### **3.4 RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması**

RPMI 1640 besiyeri satın alınarak kullanıldı.

### **3.5 PBS (Fosfat) Tamponunun Hazırlanması**

800 ml distile su içerisinde, 10 mM (1.44 gr.)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 1,76 mM (0.24 gr.)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözdürülerek üzerine 8 gr. NaCl ile 0,2 gr. KCl ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlanarak 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH ile pH 7,4'e ayarlandı.

### **3.6 Heparinize Kan Örneği Alınması**

Deney sırasında hücre kültürüne eklemek üzere 29 yaşında sağlıklı, sigara içmeyen bir gönüllüden alkolle temizlenerek antekübital bölgeden heparinli kan tüpüne 20 ml kan örneği alındı. Örnek alınmadan önce gönüllüye onam formu ( Etik Kurul:04.06.2013/ 6. oturum 02 sayılı karar) okutulup imzalatıldı.

### 3.7 Mononükleer Lökositlerin Separasyonu

Boş steril 4 tüp içine 5' er ml Histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 5'er ml taze heparinize kan yavaşça konuldu. Tüpler 25° C ve 2100 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabakada lökositler eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü Histopaque solüsyonu ve en üst tabakada ise plazma yer aldı.

Santrifügasyon sonrası orta tabakada biriken lenfositler 1 ml'lik pipet yardımıyla boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lökosit içeren histopaque üzerine 5 ml, 1 M tuzlu fosfat tamponu (PBS) (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 25° C, 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve altta kalan lökosit pelleti PBS ile sulandırılarak hücre kültür ortamlarına ilave edildi.

### 3.8 Mononükleer Lökositlerin Sayımı

Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli lökosit hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından Thoma lamı üzerine yaydırılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına yayılması sağlandı. Bu işlem yapılırken lam ve lamel arasında kabarcık olmamasına özen gösterildi. Hemositometre üzerinde 25 mm<sup>2</sup>'ye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formülden toplam lökosit hücre sayısı belirlendi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{10^4 \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}}{\text{Sabit katsayı (Hacim)}}$$

### 3.9 *In Vitro* Deney Ortamının Hazırlanması ve Deneyin Yapılması

*In vitro* deney prosedürü oluşturulurken Noroozi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan faydalanıldı(85). PBS’de sulandırılarak elde edilen lökositler kültür çözeltilisine (%80 RPMI 1640 Medium, %20 Fetal Bovine Serum (FBS)) aktarıldıktan sonra hücre kültürü ortamına PBS de çözdürülen nar suyu ekstraktları son konsantrasyonları 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 1 µg/ml olacak şekilde 5ml’lik hücre kültür flasklarına eklendi. Hazırlanan nar suyu ekstraktlı hücre kültürü flaskları 37 °C’de 30 dk. %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler 1600 rpm de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatantı TAS, TOS ölçümü için ayrıldı. Santrifüj işleminden sonra kalan pelletler 110µl PBS ile sulandırılarak hücreler nar suyu ekstraktından uzaklaştırılmış oldu. PBS ile sulandırılan hücrelerden 10µl alınarak comet assay yapıldı. Geriye kalan 100 µl’lik PBS ile sulandırılmış hücrelerin üzerine kültür çözeltilisi (%80 RPMI 1640 Medium, %20 Fetal Bovine Serum (FBS)) eklendikten sonra hücreler 5 dk. 50µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’e maruz bırakıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’den sonra hücreler 1600 rpm de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantı TAS, TOS ölçümü için ayrıldı ve pellet ile comet assay yapıldı. Çalışmamız da kullanılan gruplar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Kont(-) (Negatif Kontrol)</b> | :Kültür Çözeltilisi + hücre                                |
| <b>NSE100</b>                    | : Kültür Çözeltilisi + hücre + 100µg/ml nar suyu ekstraktı |
| <b>NSE20</b>                     | : Kültür Çözeltilisi + hücre + 20µg/ml nar suyu ekstraktı  |
| <b>NSE4</b>                      | : Kültür Çözeltilisi + hücre + 4µg/ml nar suyu ekstraktı   |
| <b>NSE1</b>                      | : Kültür Çözeltilisi + hücre + 1µg/ml nar suyu ekstraktı   |

Değişik Nar suyu ekstraktı konantrasyonuna maruz kalan hücreler PBS’le yıkandıktan sonra 5 dk. 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruz bırakılmış ve bu gruplarda aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

**HKont(+)** (Pozitif Kontrol) :Kültür çözeltilisi + PBS’le yıkanan hücreler 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**NSE100-H** : Kültür çözeltilisi + 100 µg/ml NSE maruz kalan PBS’le yıkanan hücreler + 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**NSE20-H** : Kùltür çözültisi + 20 µg/ml NSE maruz kalan PBS'le yıkanan hücreler + 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**NSE4-H** : Kùltür çözültisi + 4 µg/ml NSE maruz kalan PBS'le yıkanan hücreler + 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**NSE1-H** : Kùltür çözültisi + 1 µg/ml NSE maruz kalan PBS'le yıkanan hücreler + 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **3.10 Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi**

#### **3.10.1 Yöntemin Prensibi**

Mononükleer lökosit DNA hasarı Singh ve ark. tarafından geliştirilen Alkali Tek Hücre Elektrophorez (Comet Assay) yöntemi Noroozi ve ark. yaptığı şekilde modifiye edilerek çalışıldı(85,86). Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı moleköl ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklıklara göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler agaroz jelle yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmayacak şekilde yürürler. Oysa DNA zincirinde herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleköl ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar.

Elektrophorezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış cometler gözle veya bilgisayar programları ile değerlendirilebilir.

#### **3.10.2 Slaytların Hazırlanması**

%1'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanıp eritildikten sonra 80 µl alınarak kenarları buzlanmış lamalar üzerine damlatıldı. Lamların üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lameller kaldırıldı. Hazırlanan lamalar

nemli kutularda bekletildi. PBS tamponu ile mm<sup>3</sup> te 104 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,7'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi. Ardından lameller kaldırılarak slaytların hazırlanma işlemi tamamlandı.

### **3.10.3 Lizis aşaması**

Hücre zarlarının parçalanması için önce 2,5 M Sodyum klorür, 100 mM EDTA ve 10 mM trizma base distile suda çözülerek stok lizing solüsyonu hazırlandı(pH=10). Çalışmadan hemen önce stok lizing solüsyonuna %1 oranında triton X-100 ve %10 oranında DMSO eklendikten sonra slaytlar 50 dakika bu taze soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

### **3.10.4 Elektforez tamponu**

Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektforez tamponunda 30 dakika bekletildi. Alkali elektforez tamponu 1mM Na<sub>2</sub>EDTA ve 300 mM NaOH'tan oluşmaktadır(pH <13).

### **3.10.5 Elektforezde yürütme**

Alkali elektforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5-25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

### **3.10.6 Nötralizasyon**

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektforez tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) ile yıkandı.

### **3.10.7 Boyama**

Nötralizasyon işleminden sonra boyama yapılarak cometler sayılır veya jel oda sıcaklığında kurutularak slaytlar nemli ortamda en fazla bir hafta depolanabilir. Boyama işlemi için floresan bir boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme işlemi için DNA'lar hasar düzeyine göre 5 evreye (0, 1, 2, 3 ve 4) ayrıldı.

### **3.10.8 Oluşan DNA Hasarının Değerlendirilmesi**

Bu yöntemde DNA hasarı Floresan Mikroskopta (Olympus) gözle değerlendirildi. DNA da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre her bir okumada 100 hücre DNA'sı incelenerek beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0 maksimum hasar olan DNA'lar 4 olarak değerlendirildi. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermekte idi. Hasar birimi olarak "Arbitrary Unit" (AU) kullanıldı (11).

### **3.11 Total Antioksidan Seviye**

Özcan Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur (87).

#### **3.11.1 Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar**

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 µM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çözdürülerek hazırlanır. 240 nm’de spektrofotometrik olarak end-point ölçüm yapılır.

### **3.11.2 Prensip**

$Fe^{+2}$ -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH’da renksiz odianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluştururlar. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadır. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar “mmol Trolox Equivalent/L” olarak ifade edilir.

### **3.12 Total Oksidan Seviye**

Özcan Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (88).

#### **3.12.1 Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar**

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM  $H_2SO_4$  çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra 250 uM ksilenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidin dihydrochlorid çözdürülüp sonra 5 mM amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır. 560 nm’de spektrofotometrik olarak end-point ölçüm yapılır.



### 3.12.2 Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılır. Sonuçlar “μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L” olarak ifade edilir.

### 3.13 Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) değeri elde edilen TAS ve TOS değerine göre aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{OSİ (Arbitrary Unit – AU)} = \frac{\text{TOS } \left( \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \frac{\text{equiv}}{\text{L}} \right)}{\text{TAS } \left( \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}} \frac{\text{equiv}}{\text{L}} \right)} \times 100$$

## 4. BULGULAR

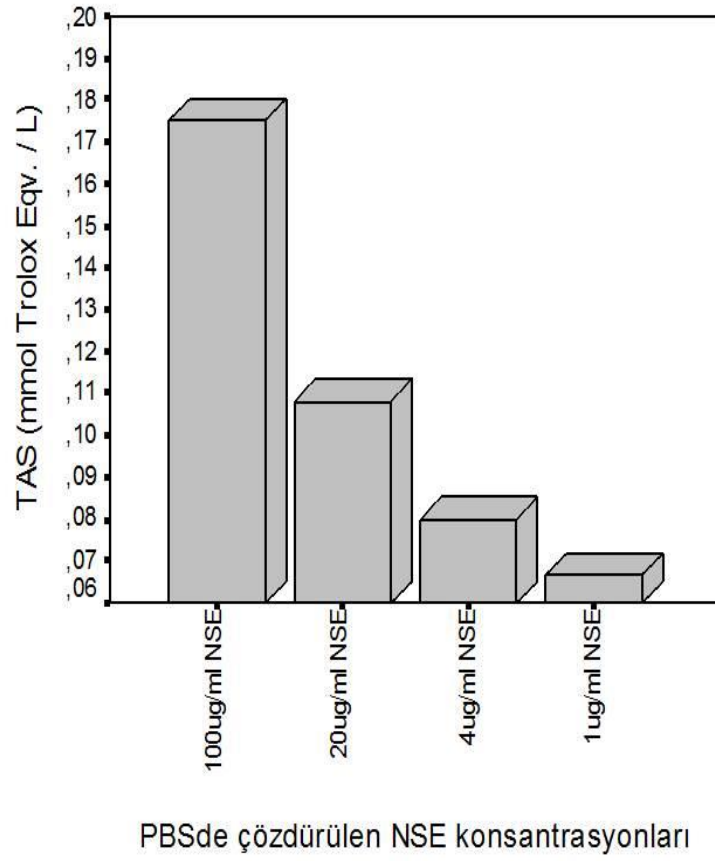
Çalışmamızda kontrol grubuna göre değişik konsantrasyonlarda nar suyu ekstraktı uygulanan hücrelerde DNA hasarı ve oksidatif stres parametreleri olan total oksidan seviye, total antioksidan seviye değişimleri değerlendirildi. Aynı hücre grupları PBS'le yıkanmış ve 5dk. 50µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz kaldıktan sonra aynı parametreler açısından tekrar değerlendirilmiştir. Çalışmamız üç defa tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler SPSS 11.5 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 4.1 Oksidatif Stres İle İlgili Bulgular

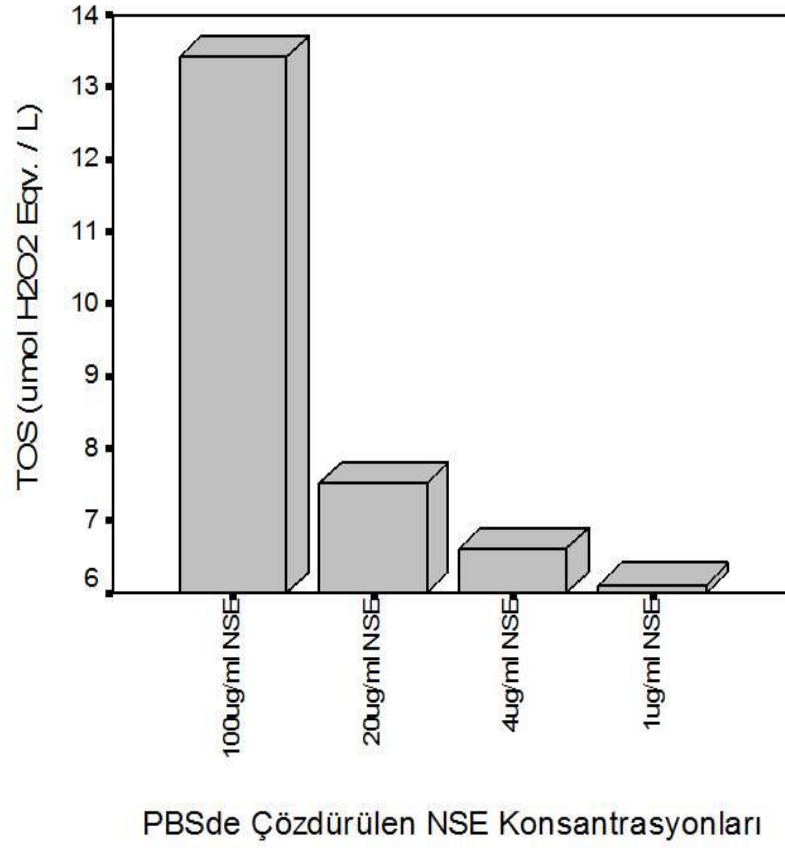
Oksidatif stres parametreleri ile ilgili olarak deney gruplarında Erel yöntemi ile TAS, TOS değeri çalışıldı ve OSİ değeri hesaplandı (Tablo 4). Çalışmamızda kullandığımız nar suyu ekstrakt konsantrasyonlarının total oksidan seviye ve total antioksidan seviye sütun grafikleri, Şekil 12 ve 13'de gösterilmiştir.

| PBS'de çözdürülen NSE | TAS (mmol Trolox Eqv./L) | TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L) | OSİ (AU) |
|-----------------------|--------------------------|---|----------|
| 100µg/ml              | 0,17                     | 13,41   | 7,67     |
| 20µg/ml               | 0,11                     | 7,51  | 6,94     |
| 4µg/ml                | 0,8                      | 6,61  | 8,26     |
| 1µg/ml                | 0,7                      | 6,11  | 9,13     |

**Tablo 4 :** PBS'de Çözdürülen NSE'nin TAS, TOS, OSİ değerleri



**Şekil 12 :** PBS’de çözdürülen nar suyu ekstrakt konsantrasyonlarının total antioksidan seviyeleri

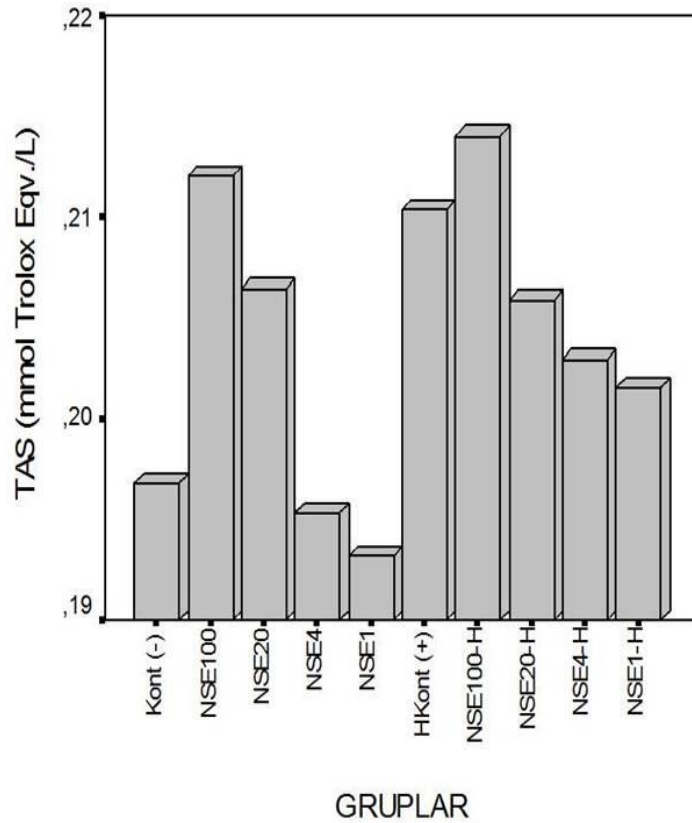


**Şekil 13** : PBS’de çözdürülen nar suyu ekstrakt konsantrasyonlarının total oksidan seviyeleri

Değişen konsantrasyonlarda Nar suyu ekstraktı uygulanan hücrelerin TAS, TOS değerleri ve 5 dk. 50µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’e maruz kaldıktan sonraki değerleri Tablo 5, Şekil 14 ve 15’de gösterilmiştir.

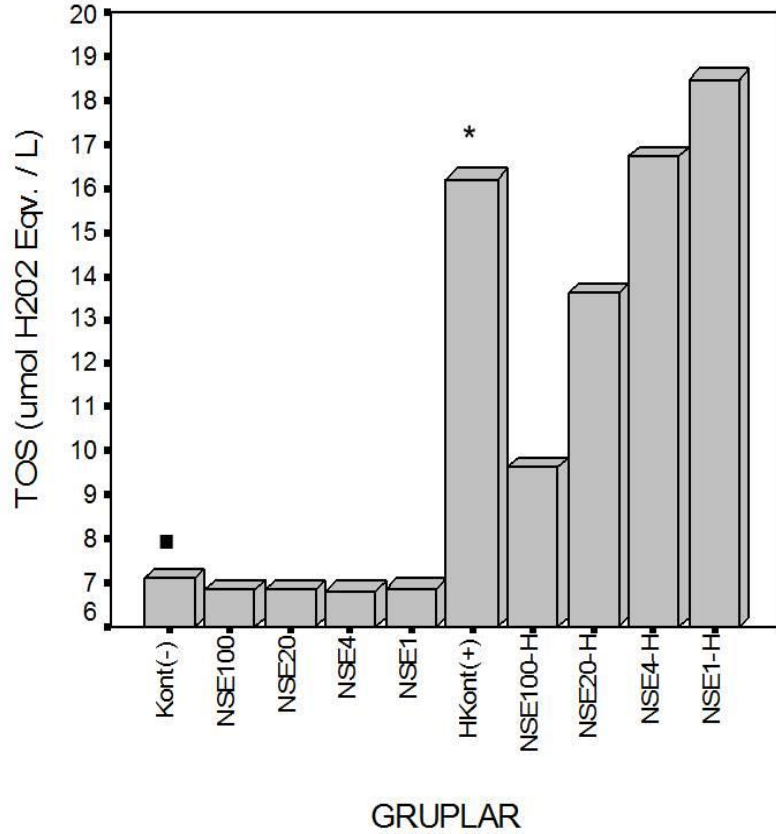
| GRUPLAR         | DNA HASARI (AU) | TAS (mmol Trolox Eqv./L) | TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L) | OSİ (AU)          |
|-----------------|-----------------|--------------------------|---|-------------------|
| Negatif Kontrol | 4,8 $\pm$ 0,3   | 0,196 $\pm$ 0,008        | 7,086 $\pm$ 0,198                           | 3,609 $\pm$ 0,265 |
| NSE100          | 6,0 $\pm$ 0,6   | 0,212 $\pm$ 0,030        | 6,836 $\pm$ 0,046                           | 3,265 $\pm$ 0,437 |
| NSE20           | 5,0 $\pm$ 0,5   | 0,206 $\pm$ 0,018        | 6,826 $\pm$ 0,064                           | 3,323 $\pm$ 0,282 |
| NSE4            | 2,75 $\pm$ 0,5  | 0,195 $\pm$ 0,001        | 6,806 $\pm$ 0,187                           | 3,443 $\pm$ 0,085 |
| NSE1            | 2,7 $\pm$ 0,2   | 0,193 $\pm$ 0,008        | 6,850 $\pm$ 0,155                           | 3,721 $\pm$ 0,001 |
| Pozitif Kontrol | 340 $\pm$ 20    | 0,210 $\pm$ 0,012        | 16,216 $\pm$ 1,192                          | 7,575 $\pm$ 1,140 |
| NSE100-H        | 208 $\pm$ 6     | 0,214 $\pm$ 0,003        | 9,623 $\pm$ 2,285                           | 4,292 $\pm$ 1,368 |
| NSE20-H         | 310 $\pm$ 20    | 0,205 $\pm$ 0,009        | 13,596 $\pm$ 1,680                          | 6,605 $\pm$ 0,788 |
| NSE4-H          | 325 $\pm$ 25    | 0,202 $\pm$ 0,009        | 16,723 $\pm$ 1,045                          | 8,406 $\pm$ 1,016 |
| NSE1-H          | 345 $\pm$ 5     | 0,201 $\pm$ 0,002        | 18,480 $\pm$ 0,113                          | 9,290 $\pm$ 0,001 |

**Tablo 5 :** Grupların DNA Hasarı, TAS, TOS, OSİ değerleri (Mean + SD)



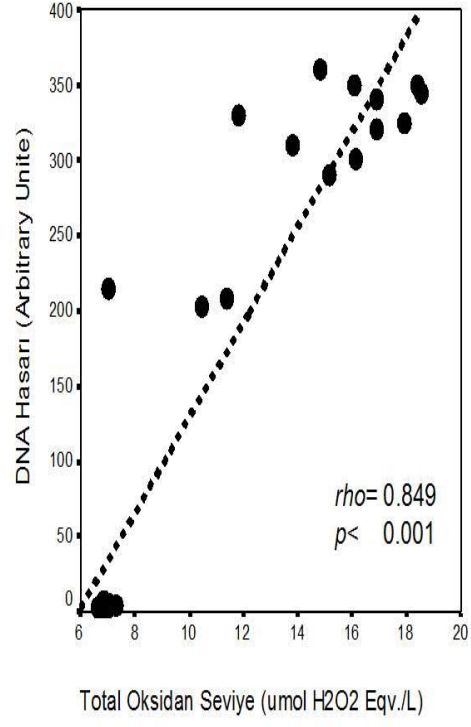
**Şekil 14 :** 100 $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  NSE ve 50  $\mu\text{mol/ml}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulanan hücrelerin ve total antioksidan seviyeleri

Gruplar arasındaki farklılıklar non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,515$ ). İstatistiki açıdan fark bulunmasa da Şekil 14’de görüldüğü üzere NSE100, NSE20 ve NSE100-H gruplarında kontrol gruplarına göre TAS artmıştır.



Şekil 15 : 100µg/ml,20 µg/ml,4 µg/ml,1 µg/ml NSE ve 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerin total oksidan seviyeleri

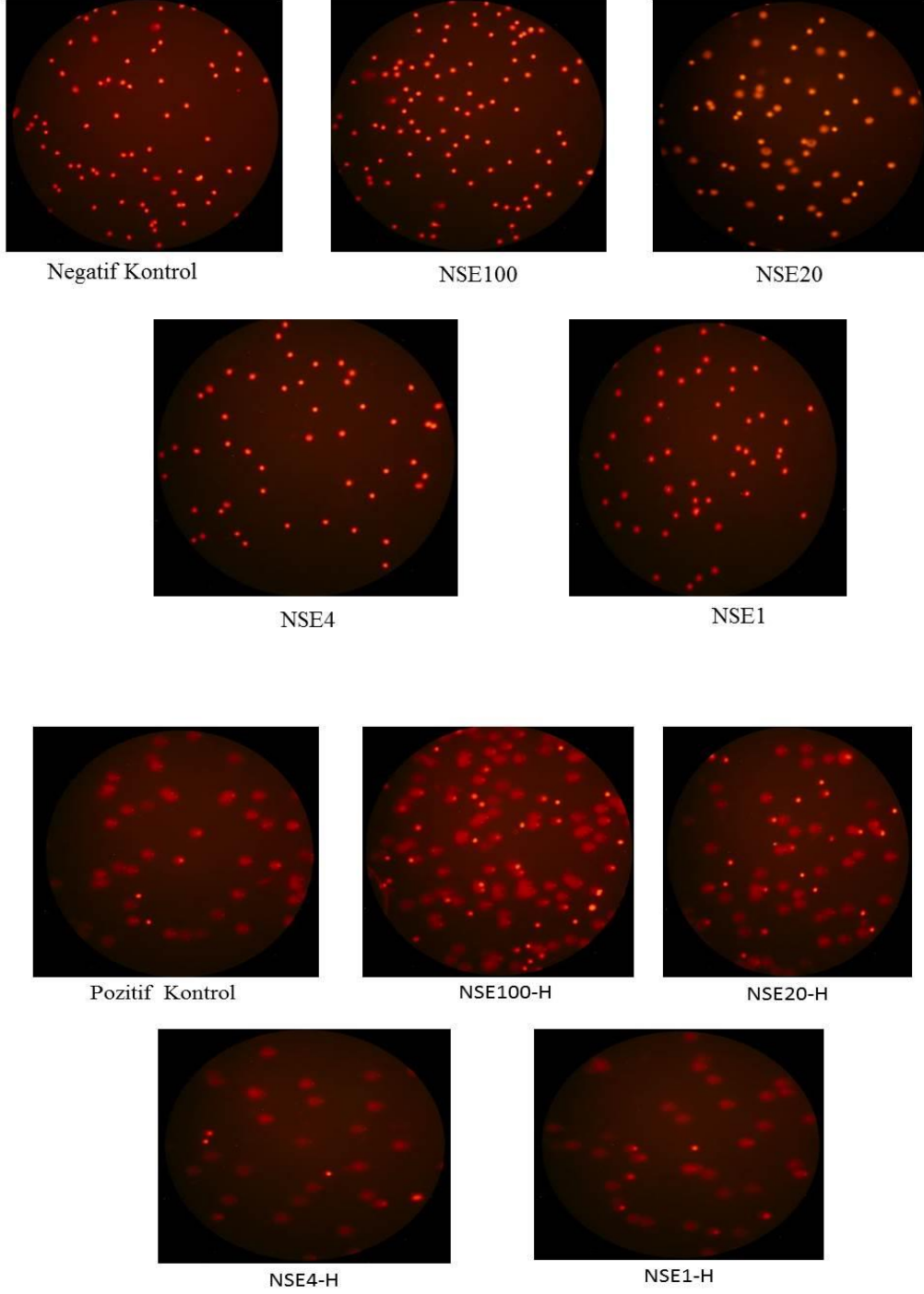
Gruplara non-parametrik istatistik analizleri Kruskal Wallis H ve Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.04$ ). İki grup arasındaki farklılık Mann-Whitney U karşılaştırılmış, ■Kont(-) ile NSE100 ( $p=0.046$ ), \*HKont(+) ile NSE100-H ( $p=0,05$ ) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca TOS ile DNA hasarı arasında spearman korelasyon analizine göre pozitif bir korelasyon bulunmuştur ( $p<0.001$ ,  $\rho=0,849$  hepsi için). (Şekil:16)



Şekil 16 : TOS ile DNA hasarı arasındaki Serman korelasyon analizi

#### 4.2 DNA Hasarı İle İlgili Bulgular

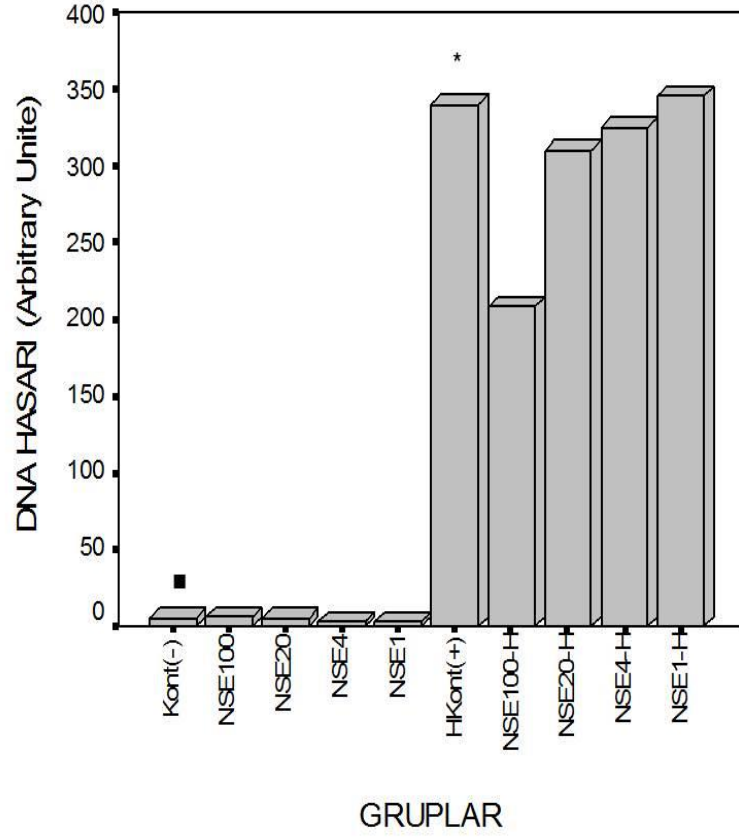
DNA hasarı ile ilgili örnek resimler Şekil : 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17 : Çalışma gruplarının örnek comet assay fotoğrafları

Comet assay yöntemine göre mononükleer hücre kültür ortamındaki DNA hasarı Şekil:18’de gösterilmiştir.





Şekil 18 : 100µg/ml,20 µg/ml,4 µg/ml,1 µg/ml nse ve 50 µmol/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerin DNA hasarı

Gruplara Kruskal Wallis H ve Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.001$ ). İki grup arasındaki farklılık Mann-Whitney U karşılaştırılmış, ■Kont(-) ile NSE100 ( $p=0,046$ ), ■Kont(-) ile NSE4 ( $p=0,046$ ), ■Kont(-) ile NSE1 ( $p=0,046$ ) ve \*HKont(+) ile NSE100-H ( $p=0,05$ ) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. HKont(+) ile NSE20-H ( $p=0,127$ ) ve HKont(+) ile NSE4-H ( $p=0,513$ ) arasında istatistiksel olarak fark bulunmasa da Şekil 18’de görebileceğimiz gibi HKont(+)'e göre DNA hasarı azalmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda fito-biyokimya alanında pek çok çalışma çeşitli bitkilerin, sebze ve meyvelerin antioksidan, antitümoral, antienflamatuar, antiviral, antimikrobia vb. etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (89). Günlük yaşamımızda tedavi için olmasa bile önemli bir tüketim yüzdesine sahip bu bitki, meyve sebzelerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri giderek derinleşen bir şekilde ilgi çekmeye devam etmektedir. Mevcut çalışmamızda çok sık tüketilen meyveler arasında yer alan nar meyvesinin antioksidan özelliklerini tıbbi biyokimyasal açıdan incelemeyi hedefledik. Bilindiği üzere nar sadece meyve olarak değil suyu, ekstraktı, tohumu veya ekşisi gibi farklı şekillerde tüketilmektedir. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki nar suyu ekstraktının, hücre kültürü ortamında mononükleer lökosit hücrelerde genotoksisite, oksidatif durum ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin(Hidrojen peroksit) genotoksik etkisine karşı antigenotoksik, antioksidatif etkileri araştırılmıştır.

Yaşamımız için vazgeçilmez olan oksijen kulağımıza garip gelse de belli koşullarda vücudumuza zarar verebiliyor. Oksijenin bu olası zararının nedeni, vücudumuzda oksijen kullanılarak gerçekleşen metabolik tepkimelerin sonucunda kimyasal tepkimeye girmeye yatkın yani tepkin (reaktif) oksijen türlerinin oluşmasıdır. Serbest radikaller olarak bilinen bu moleküller, lipit, protein, DNA ve benzeri hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Bu tip zararlı etkilere bağlı olarak, erken yaşlanma, kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi sorunlar meydana gelmektedir. Oksidatif hasar olarak nitelendirdiğimiz bu zararlara karşı da antioksidanlar dediğimiz oksidantlarla mücadele eden koruyucu moleküller imdadımıza yetişmektedir (90). Kandemir ve arkadaşları, obsesif kompulsif bozukluğu olan çocuklar ve yetişkinler üzerindeki çalışmalarında, hastalığın patofizyolojisinde, oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğunu ve hastalığın tedavisinde antioksidan desteğinin konvansiyonel farmakoterapide yararlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (91).

Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi tetiklemektedir. Temel olarak oksidatif stres, biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Hücreler hafif oksidatif stresi tek başlarına tolere edebilseler de genellikle bunu başarmak için mevcut antioksidan enzim sistemlerini

aktive ederler. Ancak, hücre içi antioksidan savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında belirtildiği üzere, reaktif oksijen bileşikleri (ROB) ile antioksidanlar arasındaki denge bozulmaktadır, dolayısıyla oksidatif hasara duyarlı DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücrel makromoleküller zarar görmektedir (92). Çalışmamızda mononükleer hücreler üzerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan ve TOS ile ifade edilen toplam oksidatif kapasite nar ekstraktı konsantrasyonunun artmasıyla azalmaktadır. Nitekim çalışmamızda TOS ile DNA hasarı arasında Spearman korelasyon analizine göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı pozitif bir korelasyon bulunmuştur ( $p < 0.001$  rho: 849).

Tezimizin ‘Genel Bilgiler’ bölümünde detaylı olarak ifade edildiği gibi vücudun antioksidan savunma sistemi farklı antioksidan bileşiklerden oluşmakta ve bu bileşiklerin antioksidan kapasiteleri vücutta üretilen serbest radikaller ve gıdalarla alınan antioksidanlar arasındaki dengeye göre değişmektedir. Özellikle sebze ve meyveler, hem yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları hem de iyi bir antioksidan karışımı veya kombinasyonu temsil etmeleri açısından çok önemli doğal antioksidan kaynakları arasında sayılmaktadır (93).

Yapılan bir çalışmada günlük beş porsiyon meyve ve sebze tüketen kişilerde felç olma riskinin % 25 azaldığı tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda antioksidan bakımından zengin besinlerle beslenmenin birçok hücre ve dokuların çeşitli yapısal değişimlere uğraması sonucu oluşacak hastalıklara yakalanma riskini düşürdüğü görülmüştür (90).

Çoğu bilim insanı eğer sağlığa birçok faydası olan antioksidanlardan yararlanmak ve kalp hastalıklarına yakalanma riskimizi azaltmak istiyorsak hazır antioksidan desteği almak yerine, antioksidan bakımından zengin besinlerle beslenmemizin doğru olduğunu vurgulamaktadır (90).

Sentetik antioksidan takviyesinin mortalite üzerine hiçbir katkısı olmadığını, özellikle A ve E vitaminlerinin tek ya da başka antioksidanlarla beraber kullanıldığı durumlarda ölüm riskinin yükseldiğini söyleyen çalışmalar da mevcuttur (90,94). 2003’de 12 çalışmanın site edildiği bir çalışmanın meta-analizinde vitamin E takviyesinin kardiyovasküler ölüm ve

serobrovasküler olaylara faydalı olmadığını, ayrıca Beta karoten desteğinin, her türlü ölüm türünde ve kardiyovasküler ölümden az miktarda artış gösterdiğini belirtmişlerdir (95). 2006 yılında 6 çalışmanın site edildiği bir çalışmanın meta-analizinde, Selenyum desteklemesinin, koroner kalp hastalığı riskini azaltmadığını rapor etmişlerdir (95). Myung ve arkadaşları, vitamin ve antioksidan desteklemesinin kardiyovasküler hastalıkları önlediğini gösteren hiçbir kanıt bulamadıklarını ve son meta-analizlerinde vitamin ve antioksidan desteklemesinin artmış mortalite ile ilişkili olduğunu, kanser üzerinde önleyici bir etkisi bulunmadığını, hatta bazı kanser türlerinin artışıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (95).

Klinik deneyler ve epidemiyolojik çalışmalar sebze ve meyve alımıyla, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar arasında ters bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Polifenoller, vitamin E,C ve karotenoidleri içeren diyet antioksidanlarının, oksidatif strese bağlı hastalıkları önlemede etkin rol alan sebze ve meyvelerin bileşenleri oldukları düşünülmektedir (96).

Nar suyunda bol miktarda bulunan tannin (punicalin ve punicalagin) ve antosiyaninler gibi polifenolik flavanoid antioksidanlar molar bazda; vitamin C, E, koenzim Q-10 ve alfalipoik asit gibi birçok maddeden daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda nar suyu diğer tüm meyvelerden ve kırmızı şaraptan daha fazla antioksidan aktiviteye sahiptir (78,83). Nar suyundaki antioksidan maddelerin sadece *in vitro* ortamda değil aynı zamanda *in vivo* ortamda da olumlu antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (78,83,84).

Punicalagin, Ellagik asit, TPT (standardize toplam nar tannin (%85 punicalagin anomerleri, %1,3 ellagik asit,%12 minör ellagitanninler, ellagik asit glikozitleri)) ve nar suyunun *in vitro* antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (97). 100µg/ml de nar suyu, Ellagic asit, punicalagin ve TPT (standardize toplam nar tannin) HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklemiştir (97). Ayrıca Punicalagin, ellagik asit ve TPT (standardize toplam nar tannin), insan oral, prostat ve kolon tümör hücrelerinin sayısını düşürmüştür. Ancak üstün aktivite saf nar suyuyla sağlanmıştır. Buna benzer olarak apoptozis çalışmalarında punicalagin, ET(Ellagitannin) ve TPT konsantrasyonları nar suyundakiyle eşitlendiğinde hiçbir etki oluşturmazken, nar suyu HT29

kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklemiştir. Bu bileşenlerin konsantrasyonları sadece nar suyu ile aynı miktarda iken apoptozisi indükleyebilmiştir (97). Çalışmamızda, 100µg/ml de nar suyunda negatif kontrol grubumuza göre DNA hasarında anlamlı düzeyde artma saptadık ( $p=0,046$ ). Negatif kontrol grubuna göre NSE100 grubunda, TOS'un düşük, TAS'ın yüksek olmasına rağmen DNA hasarının artma nedeni olarak da, bu çalışmada olduğu gibi, indüklenmiş apoptozis muhtemel olasılıklar arasında yer almaktadır.

Bianca Fuhrman ve arkadaşları diyabetik hastaların nar suyu tüketiminin, serum ve makrofajlarda oksidatif stresi azalttığını belirtmişlerdir (98). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak negatif kontrol grubuna göre, NSE100 ( $p=0,046$ ), NSE20, NSE4, NSE1 ve pozitif kontrol grubuna göre de NSE100-H ( $p=0,05$ ), NSE20-H gruplarında TOS seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir.

Sağlıklı 11 erkek ve bayana, nar ekstraktı verilmeden önce 3 gün boyunca polifenol ve antioksidansız diyet uygulanmıştır. Bu kişilere günlük olarak 800 mg nar ekstraktı kapsülü (330.4 mg punicalagin, 21,6 mg ellagik asit) verilmiştir. Bu çalışmada ekstrakt uygulanmasından yarım saat içinde plazma antioksidan seviyesinde kaydedeğer bir artış (%38) gözlenmiştir. Ayrıca bir ve iki saatlik zaman dilimlerinde değerler sırasıyla 1,62 ve 1,43 kat artmıştır. Bizim çalışmamızda da, *in vitro* olarak mononuclear hücreler değişik konsantrasyonlardaki nar suyu ekstraktında 30 dk. inkübasyona bırakılmış ve konsantrasyonun artmasıyla birlikte TAS seviyelerinin de yükseldiği gözlenmiştir.

Normal insan keratonositleri kullanan *in vitro* çalışmalar, 10-40µg/ml nar ekstraktı ile inkübe edilmiş hücre kültürlerinin, doz ve zaman bağımlı ultraviole A ve B radyasyonla indüklenmiş hücre hasarını iyileştirdiği gözlenmiştir (99). Ayrıca 20µg/ml nar ekstraktı zaman bağımlı UV-B ilişkili MAPK (Mitojen ile aktive olan protein kinaz) fosforilasyonunu inhibe etmiştir (100).

Çalışmamızda, pozitif kontrol grubuna göre NSE100-H( $p=0,05$ ), NSE20-H, NSE4-H gruplarında NSE konsantrasyonuna bağımlı olarak DNA hasarı düşmüştür. Bu nedenle eldeki veriler ışığında, nar suyunun, hidrojen peroksitin oluşturduğu genotoksisiteye karşı

anti-genotoksik etkisi olduğunu düşünebiliriz. Ayrıca, negatif kontrol grubuna göre NSE4( $p=0,046$ ) ve NSE1( $p=0,046$ ) gruplarında DNA hasarı düşük bulunmuştur. Bu sonuca göre, düşük konsantrasyonlarda nar suyunun, hücrenin oksidatif stresini azaltarak mevcut DNA hasarını düzelttiği, ancak hücrenin yüksek oksidatif strese maruz kaldığı durumlarda ise nar suyu konsantrasyonlarının koruyucu olabilmesi için daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanması gerektiği gözükmektedir. Fakat bu sonucun *in vivo* ve *in vitro* daha kapsamlı ve detaylı ileri çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir.

## 6. SONUÇ

Yapılan çalışmalar da göstermektedir ki diyetle sebze ve meyve ağırlıklı beslenme birçok hastalıktan korunmada etkin rol oynamaktadır. Her türlü meyve ve sebze insanlara faydalı olmakla beraber literatür ve çalışmamız ışığında özellikle likopen, karoten, betalain, tannin ve antosyanin gibi polifenolik flavanoid antioksidanları içeren meyve sebzelerin faydalı etkilerinin daha yüksek olduğunu söylememiz mümkündür. Çalışmamızda elde edilen bulgularla, nar suyunun anti-genotoksik ve antioksidatif etkilerinin olduğunu *in vitro* olarak göstermiş olduk. Dolayısı ile bu etkilerinden faydalanılabileceği, ancak maksimum anti-genotoksik aktivitenin tespit edilebilmesi için mutlaka *in vivo* olarak optimum konsantrasyon çalışmaları ile desteklenmesi, anti-kanser özellikleri ile ilgili olarak da daha detaylı ve ileri hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak nar suyu, anti-genotoksik ve antioksidatif etkilerinden dolayı, oksidatif stresin arttığı durumlarda ortaya çıkan veya çıkabilecek oksidatif hasarın önlenmesinde ya da ortadan kaldırılmasında oldukça etkin rol oynadığını ve bu etkilerden dolayı antiinflamatuvar, dejeneratif, kronik hastalıklarda, yaşlanmaya bağlı patolojik durumlarda ve kanser tedavisinde önleyici ve/veya destekleyici tedaviler arasında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyal. ve Transplant. Derg. 1997;3(4):92–5.
2. Yeşilada E. Ottan Fitofarmasötiğe; Güncel Fitoterapi. Türk Eczac. birliği yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Derg. 2012;(27-28):6.
3. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 2004 Mar 12;74(17):2157–84.
4. Ayan AK, Çalışkan Ö, Çırak C. Isırganotu (*Urtica spp.*)’nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. Anadolu J. Agric. Sci. 2012;21(3):357–63.
5. Basaran AA. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildir. 2004 p. 29–31.
6. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel B. DNA Hasarı Analizinde  $\mu$ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Türk Klin. Biyokim. Derg. 2004;2(3):97–103.
7. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik Toksikite Testleri. Türk Bilim Araştırma Vakfı Derg. 2011;4(3):221–9.
8. Bingöl G. Biyokimya. 50th ed. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi; 1978. p. 212.
9. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
10. Berg J., Tymoczko J., and Stryer L. Biochemistry. W. H. Freeman and Company; 2002.
11. Bektaş İ. Hücre Kültür Ortamında Çörek Otu (*Nigella Sativa*) ve Sarımsak (*Allium Sativum*) Ekstraktlarının DNA Hasarı Üzerine Etkisinin Araştırılması. Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD, Yüksek Lisans Tezi; 2010.
12. Nükleik Asitlerin Yapısı ve Elemanları [Internet]. 2013. Available from: <http://www.biyolojisozluk.com/ders/lys-nukleik-asit-konu-anlatimi/#axzz2cRcLYtBC>
13. DNA molekülü [Internet]. 2013 [cited 2013 Aug 19]. Available from: <http://afl.axtelsoft.com/tag/junk-dna/>
14. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. Türk Klin. Biyokim. Derg. 2009;7(2):61–70.



15. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokim. Derg.* 2007;32(3):104–11.
16. Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klin. J. Med. Sci.* 2010;30(4):1365–73.
17. Bilge Debeleç-Bütüner, Kantarcı G. Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi. *J. Fac. Pharm, Ankara.* 2006;35(2):149–70.
18. Chu G. Biochemistry 201: DNA repair [Internet]. Available from: <http://cmgm.stanford.edu/biochem201>
19. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klin. Biyokim. Derg.* 2009;7(2):61–70.
20. Müftüoğlu M. DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. *Türk Biyokim. Derg.* 2003;28(1):20–4.
21. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):39–85.
22. De Baer J, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):453–60.
23. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2012;1(2):7–18.
24. Fışkın K, Özlü E. Genomun Yaşlanması: Yaşam ve Ölümde DNA'nın İkili Rolü (Yaşlanmada DNA Tamiri ve Genom Stabilitesi). *Türkiye Klin. Tıp Bilim. Derg.* 2008;28(Suppl):16–20.
25. De Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijman J, Beems RB, van Steeg H, et al. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science.* 2002 May 17;296(5571):1276–9.
26. Mortelmans K, Rupa DS. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Adv. Appl. Microbiol.* 2004 Jan;56:379–401.
27. Zeiger E. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ. Mol. Mutagen.* 2004 Jan;44(5):363–71.
28. Çulcu T. İnsan Hücrelerindeki DNA Hasar ve Mutasyonlarının RAPD Tekniği Kullanılarak Araştırılması. *Anadolu Üniversitesi, Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi;* 2007. p. 3.
29. Rong Z, Yin H. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004 May;58(1):96–103.

30. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroforez ” Yöntemi İle DNA Hasar Aanalizi (Teknik Not): Comet Aanaliz Yöntemi. Harran Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2010;14(2):77–89.
31. Başbayraktar V. Soğutma ve Radurizasyonun Tavuk Eti Kalitesine Etkisinin DNA Comet Assay Yöntemi İle Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü;Gıda Mühendisliği ABD; Doktora Tezi; 2009.
32. Fidan A. Fatih. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilim. Derg. [Internet]. 2009 [cited 2013 Aug 30];8(1):53–64. Available from: [http://fmbd.aku.edu.tr/pdf/0801/8-1\(53-64\).pdf](http://fmbd.aku.edu.tr/pdf/0801/8-1(53-64).pdf)
33. Abd Hamid NA, Hasrul MA, Ruzanna RJ, Ibrahim IA, Baruah PS, Mazlan M, et al. Effect of vitamin E (Tri E®) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. Nutr. J. 2011 Jan;10:37.
34. Karakükcü Ç. Sarılıklı yenidoğanlarda bilirubin ve fototerapiden kaynaklanabilecek genotoksik etkilerin alkali comet tekniği ile değerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi; Tıp Fakültesi; Biyokimya ABD; Tıpta Uzmanlık Tezi; 2008.
35. Rojas E, Lopez M. C., Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1999 Feb 5;722(1-2):225–54.
36. Yükselten Y. Isırgan Otu ( *Urtica dioica* L . ) ve Isırgan Tohumu ( *Fructus urtica piluliferae* ) Ekstraktlarının Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Harran Üniversitesi;Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Biyokimya ABD; Yüksek Lisans Tezi; 2012.
37. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest Radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg. 2000;1:2–8.
38. Köleoğlu OM. Vücut Geliştirme Sporunun Kardiyak Fonksiyonlar, Oksidatif Stres Oluşumu ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; Tıp Fakültesi;Kardiyoloji ABD;Uzmanlık Tezi; 2008.
39. Finaud J, Lac G FE. Oxidative stress : relationship with exercise and training. Sport. Med. 2006;36(4):327–58.
40. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM HD. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med. 1987;107(4):526–45.
41. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Hastalıkların Patogenez ve Tedavisinde Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidanlar. Türkiye Nefroloji Diyal. ve Transplant. Derg. 1997;3-4:96–101.
42. Y. Gürgöze S, Şahin T, Durak M. H. Memelilerde Ortalama Yaşam Süresi ve Yaşlanma sürecinde Serbest Radikallerin Rolü. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 2007;33(1):43–9.

43. Andrew P Wickens. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.* 2001;128(3):379–91.
44. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996 Jul 5;273(5271):59–63.
45. Weindruch R, Sohal R. S. Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* 1997;337:986 – 994.
46. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası.* 1995;48:253–62.
47. Southorn P. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 1988;63:390–408.
48. Derviş E. Oral Antioksidanlar. *Dermatoz.* 2011;2(1):263 – 267.
49. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006;160:1–40.
50. Gökpınar Ş, Koray T, Akçiçek E, Göksan T, Durmaz Y. Algal Antioksidanlar. *E.Ü Su Ürünleri Derg.* 2006;23(Ek (1/1)):85 – 89.
51. Percival M. Antioxidants. *Clin. Nutr. Insights.* 1998;10:1–4.
52. Podda M, Grundmann-Kollmann M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.* 2001;26:578 – 582.
53. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomed. Pharmacother.* 2007;61:412–22.
54. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji.* 11. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2005. p. 613 – 620.
55. Kurt N. Yaşa Bağlı Olarak Antioksidan Enzimlerinin Superoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) Aktivitelerinin ve Malondialdehit (MDA) Seviyesinin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Kimya ABD; Yüksek Lisans Tezi; 2008.
56. Fridovich I. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1983;23:239 – 257.
57. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 1997 Apr;43(4):562–8.
58. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1st ed. Mimoza Yayınları, editor. Konya; 1995. p. 17.

59. Jenkins RR, Teng J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types. *Experientia*. 1981;37(1):67 – 68.
60. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, MacCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;40:341 – 347.
61. Chaturvedi P. Bitter melon protects against lipid peroxidation caused by immobilization stress in albino rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009;79:48 – 56.
62. Milesi M-A, Lacan D, Brosse H, Desor D, Notin C. Effect of an oral supplementation with a proprietary melon juice concentrate (Extramel) on stress and fatigue in healthy people: a pilot, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutr. J.* 2009 Jan;8:40.
63. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):207–18.
64. Sarı S. Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyleus ve Taurinin, Böbrek MDA, Glutasyon, Aopp Düzeylerine ve SOD Aktivitesine etkileri. Gazi Üniversitesi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Tıbbi Biyokimya ABD; Yüksek Lisans Tezi; 2008.
65. Seven A, Candan G. Antioxidan Defense Systems. *Cerrahpasa J Med.* 1996;27:41–50.
66. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):41–54.
67. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin. Interv. Aging.* 2007 Jan;2(3):377–87.
68. Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH. The systemic availability of oral glutathione. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992 Jan;43(6):667–9.
69. Söker M. Beta Talasemili Çocuklarda Oksidan-Antioksidan Sistem ve Lenfosit DNA Hasarı. Harran Üniversitesi; Tıp Fakültesi; Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD; Hematoloji Bilim Dalı, Yan dal uzmanlık tezi; 2008.
70. Çelik H. Malarya (sıtma) hastalarında oksidatif stres ve mononükleer lenfosit DNA hasarının araştırılması. Harran Üniversitesi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Biyokimya ABD; Yüksek Lisans Tezi; 2005.
71. Burton GW. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989;119:109–11.
72. Güzel EÇ. Hipertiroidili kadın hastalarda vitamin E düzeyleri. Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi; Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi; 2007.
73. El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen

- quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem. Toxicol.* 2004 Oct;42(10):1563–71.
74. Frank J. Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E status. *J. Plant Physiol.* 2005 Jul;162(7):834–43.
  75. Karaca E. Nar suyu konsantresi üretiminde uygulanan bazı işlemlerin fenolik bileşenler üzerine etkisi. Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Gıda Mühendisliği ABD; Yüksek Lisans Tezi; 2011.
  76. Özdemir NA. Nar suyu üretimi üzerine araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü; Gıda Mühendisliği ABD; Doktora Tezi; 2001.
  77. Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.* 2007 Nov 14;55(23):9559–70.
  78. Altuğ M. Sağlıklı erişkinlerde fiziksel aktivitenin eritrosit ve plazmadaki oksidan/antioksidan parametreler üzerine olan etkilerinin belirlenmesi ve yüksek antioksidan özelliği olduğu bilinen nar suyunun bu parametreler üzerine olan etkilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Biyokimya ABD; Doktora Tezi; 2009.
  79. De Nigris F, Williams-Ignarro S, Lerman LO, Crimi E, Botti C, Mansueto G, et al. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005 Mar 29;102(13):4896–901.
  80. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis.* 2006 Aug;187(2):363–71.
  81. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 2006 Mar 8;54(5):1928–35.
  82. Ricci D, Giamperi L, Bucchini A, Fraternali D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia.* 2006 Jun;77(4):310–2.
  83. De Nigris F, Williams-Ignarro S, Botti C, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. Pomegranate juice reduces oxidized low-density lipoprotein downregulation of endothelial nitric oxide synthase in human coronary endothelial cells. *Nitric Oxide.* 2006 Nov;15(3):259–63.
  84. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur. J. Nutr.* 2007 Aug;46(5):271–8.

85. Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME, Words KEY. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr. AMER SOC CLINICAL NUTRITION*; 1998 Jun;67(6):1210–8.
86. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988 Mar;175(1):184–91.
87. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 2004 Apr;37(4):277–85.
88. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 2005 Dec;38(12):1103–11.
89. Aksoy N, Dogan Y, Iriadam M, Bitiren M, Uzer E, Ozgonul A, et al. Protective and therapeutic effects of licorice in rats with acute tubular necrosis. *J. Ren. Nutr.* 2012 May;22(3):336–43.
90. İkinci Ö. Metallerden hücrelere bir efsane : antioksidanlar. *Tübitak Bilim ve Tek. Derg.* 2010;513:58–61.
91. Kandemir H, Abuhandan M, Aksoy N, Savik E, Kaya C. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with obsessive compulsive disorder. *J. Psychiatr. Res.* 2013 Nov;47(11):1831–4.
92. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi , Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczac. Fakültesi Derg.* 2011;31(2):137–50.
93. Koca N, Karadeniz F. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda Derg.* 2005;30(4):229–36.
94. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2007 Feb 28;297(8):842–57.
95. Myung S, Ju W, Cho B, Oh S-W, Park SM, Koo B-K, et al. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease : systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Br. Med. J.* 2013;346(January):1–22.
96. Watson R, Preedy V. Bioactive food as dietary interventions for liver and gastrointestinal disease. 1. ed. Watson RR, Preedy VR, editors. Elsevier; 2013. p. 499.
97. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* 2005 Jun;16(6):360–7.

98. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition*. 2010 Apr;26(4):359–66.
99. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern. Med. Rev.* 2008 Jun;13(2):128–44.
100. Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui MS, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochem. Photobiol.* 2005;81(1):38–45.