

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI NAR ÇEŞİTLERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİ VE KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

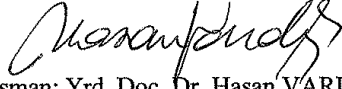
Suzan VARLIKLIÖZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

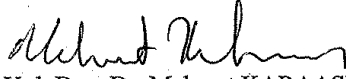
ŞANLIURFA

2011

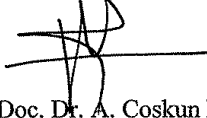
Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN danışmanlığında, Suzan VARLIKLIÖZ'ün hazırladığı "Bazı Nar Çeşitlerinin Antioksidan Aktiviteleri ve Kansere Hücreleri Üzerine Antiproliferatif Etkilerinin Belirlenmesi" konulu bu çalışma 14/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN



Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Coşkun DALGIÇ

Bu tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yapıldığını ve enstitümüz kurallarına göre düzenlendiğini onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet CİCİ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 1128

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Fenolik Bileşikler	4
2.2. Narın Kimyasal Bileşimi	7
2.3. Antioksidanlar ve Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler	11
2.4. Meyve Ekstraktlarının Kanser Hücrelerinin Çoğalmasına Etkisi	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. HepG ₂ insan karaciğer hücreleri	15
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Narda uygulanan ön işlemler	15
3.2.2. Ekstraksiyon	16
3.2.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	16
3.2.4. Toplam flavanoid içeriğinin belirlenmesi	17
3.2.5. Antosiyanin içeriğinin belirlenmesi	17
3.2.5.1. Doğal nar spektral eğrisinin belirlenmesi	17
3.2.5.2. Toplam antosiyanin tayini	17
3.2.6. Toplam antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	18
3.2.7. Kanser hücrelerinin çoğalmasının ölçülmesi	19
3.2.8. Diğer bazı analizler	20
3.2.8.1. Nar sularında titrasyon asitliği tayini	20
3.2.8.2. Nar sularında pH tayini	21
3.2.8.3. Nar sularında suda çözünür kuru madde (Ç.K.M.) tayini	21
3.2.9. İstatistiksel analizler	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. Toplam Çözünür Madde Asitlik ve pH değerleri	22
4.2. Nar Çeşitlerindeki Fenolik Madde Miktarları	23
4.3. Nar Çeşitlerinin Antioksidan ve Antiproliferatif Aktiviteleri	24
4.4. Nar Çeşitlerinin Fitokimyasal Miktarları ile Antioksidan Aktiviteleri Arasındaki İlişki	26
4.5. Nar Çeşitlerinin Fitokimyasal Miktarları ile Antiproliferatif Aktiviteleri Arasındaki İlişki	28
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	36
ÖZET	37
SUMMARY	38

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

BAZI NAR ÇEŞİTLERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİ ve KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Suzan VARLIKLIÖZ

Harran Ünivrsitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN
Yıl:2011, Sayfa: 38

Bu çalışmada narda bulunan fenolik madde miktarının *in vitro* koşullarda narın antioksidan aktivitesine ve HepG₂ insan karaciğer hücrelerinde antiproliferatif aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda Hatay Adana, Hicaz, Antalya nar çeşitlerinin fenolik madde kompozisyonu (toplam fenolik, flavanoid, antosiyanin madde miktarı) belirlenmiştir. Ayrıca narların antioksidan ve HepG₂ hücrelerine antiproliferatif aktiviteleri ölçülmüştür. Bulunan sonuçlar toplam fenolik ve flavanoid miktarının narların antioksidan aktivitesini önemli düzeyde etkilediğini göstermiştir (p<0.01). HepG₂ hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu ile fenolik madde miktarı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (p<0.01). Bu çalışma ile toplam fenolik ve flavanoid miktarı en fazla olan nar çeşidinin en yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite gösterdiği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Antioksidanlar, kanser hücre kültürü, antiproliferatif aktivite, fenolik bileşikler, nar

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINE THE ANTIOXIDANT and ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES on HUMAN LIVER CANCER CELLS GROWTH of SOME POMEGRANATE VARIETIES

Suzan VARLIKLIÖZ

**Harran University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

**Supervisor: Asist Prof. Dr. Hasan VARDİN
Year: 2011, Sayfa: 38**

In this study, the effect of pomegranate extracts' phenolic compounds to the formation of antioxidant activity and its antiproliferative activity on HepG₂ human liver cancer cells (*in vitro*) were investigated. Proliferation of pomegranate extracts *in vitro*. The composition of phenolic compound (phenolics, flavonoid, anthocyanin) in Hatay, Adana, Hicaz, Antalya pomegranate varieties were determined in this context. Also the antioxidant and antiproliferative activities on human liver cancer cell growth of pomegranate extracts were investigated. Results indicated that the amount of phenolic and flavanoid effected considerably antioxidant activity of pomegranates ($p < 0.01$). Inhibition of HepG₂ cells proliferation displayed positive correlation with the increase of the amount of phenolics ($p < 0.01$). This study indicated that, higher amount of phenolic and flavonoid contents in the pomegranate contributes to higher antioxidant and antiproliferative activities.

KEY WORDS: Antioxidants, cancer; cell culture, antiproliferative activity, phenolic compounds, pomegranate

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalıőmalarım boyunca maddi-manevi desteğini esirgemeyen fikir ve katkılarıyla çalıőmalarıma ışık tutan ve yönlendiren değerli danışman hocam, sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN' e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisansım süresince fikirleriyle bana ışık tutan sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Karaaslan'a laboratuvar çalıőmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Ar. Gör. M. Fatih Yılmaz ve Özge Cesur ve diğer arkadaşlara teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince ve eęitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini gördüęüm deęerli Ailem'e minnetle teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1 Fenolik bileşiklerin iki ana grubu	5
Şekil 2.2 Fenolik bileşiklerin sentezi	6
Şekil 2.3 Narda bulunan hidrolize olabilen tanenlerin yapısı	9
Şekil 3.1 Ekstraksiyon akış şeması	16
Şekil 3.2. MTS tetrazolyum tuzunun yapısı ve formazana dönüşümü	20
Şekil 4.1 Nar çeşitleri arasındaki renk farklılıkları	22
Şekil 4.2 Nar çeşitlerinin toplam antioksidan aktivitesinin EC ₅₀ değeri	24
Şekil 4.3 Nar ekstraktlarıyla muamele edilen HepG ₂ hücrelerinin çoğalma inhibisyon yüzdesi	25
Şekil 4.4 Nar ekstraktlarının antiproliferatif aktivitenin EC ₅₀ değeri	26
Şekil 4.5 Nar çeşitlerinin toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivitesinin EC ₅₀ değeri arasındaki ilişki	27
Şekil 4.6 Nar çeşitlerinin toplam flavanoid madde miktarı ile antioksidan aktivitesinin EC ₅₀ değeri arasındaki ilişki	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1 Narın bazı analitik ve kimyasal özellikleri.....	7
Çizelge 2.2 Bazı fenolik bileşikler ve antioksidan vitaminlerin relatif toplam antioksidan aktiviteleri .	12
Çizelge 2.3 Toplam antioksidan aktiviteye C vitaminin etkisi.....	13
Çizelge 4.1 Nar çeşitlerinin bazı özellikleri (n=3)	22
Çizelge 4.2 Nar çeşitlerinin toplam fenolik madde, flavanoid ve antosiyanin içerikleri mg/ 100g meyve (n=3)	23
Çizelge 4.3 Analiz parametreleri arasındaki korelasyon değeri (r)	28

1. GİRİŞ

Meyve ve sebzelerin düzenli tüketilmesi, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır. (Doll, 1990; Dragsted ve ark., 1993). Meyve ve sebzeler yaşam için gerekli olan çeşitli esansiyel maddeler için temel kaynaktır. Ayrıca meyve ve sebzeler önemli biyolojik aktiviteleri olan fitokimyasalları (fenolikler ve flavonoidler) da içerirler. Antioksidan özellik gösteren bu doğal bileşiklerin serbest radikalleri tutma veya normal hücre metabolizmasında reaktif türlerin oluşumunu engelleme gibi fonksiyonları vardır (Liu ve ark., 2002).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres, membran lipitlerinin oksidasyonuna, enzimlerin inaktivasyonuna ve kanser oluşumunun sebebi olan gen mutasyonlarına yol açtığı düşünülmektedir. Yeterli miktarda antioksidan alımı serbest radikallerin oluşumunu önlemektedir (Poulsen ve ark., 1998).

Meyve ve sebzelerde bulunan antioksidanların antikarsinojen ve antimutajen etki gösterdiği bulunmuştur. Deschner ve ark. (1991) tarafından, kuersetinin farelerde azoksimetanol uyarıcısıyla çoğalan epithelyal kolon tümör hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca elma fitokimyasal ekstraktı kolon kanseri ve karaciğer kanser hücrelerinin çoğalmasını konsantrasyona bağlı şekilde engellemiştir (Eberhardt ve ark., 2000).

Meyve ve sebzelerde antioksidan kapasitesinin önemli kısmının içeriğindeki toplam fenolikler ve flavanoidlerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2002). Örneğin elmada bulunan C vitaminin antioksidan aktivitesi toplam antioksidan aktivesinin sadece % 0.4' üne denk gelmektedir (Eberhardt ve ark., 2000).

Bitki fenoliklerinin antikarsinojen mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bu mekanizmalar tümör hücrelerinin çoğalmasını başlatan serbest radikalleri tutmak

veya potansiyel karsinogen reaktiflerini inaktive etmek şeklindedir (Meyers ve ark., 2003).

Üzüm nar gibi kırmızı meyveler ve bu meyvelerin suları antioksidan aktiviteleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Çeşitli biyoflavonoidleri çok miktarda içermesi ve serbest radikalleri tutma aktivitesi nedeniyle nar (*Punica granatum L.*) AIDS tedavisinde tavsiye edilmektedir (Lee ve ark., 1998). Nar ayrıca AIDS'in tedavisi için verilen Japon patentli formüldeki dokuz bitkiden biridir (Perez-Vicente ve ark; 2002).

Nar, Akdeniz Bölgesinin karakteristik bitkisi olarak bilinmektedir. Kurak ve yarı kurak iklim koşullarında yetişebildiğinden geniş bir yayılım alanı göstermektedir (Kumar, 1990). Ülkemizde en çok Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu 2008 yılı verilerine göre; Ülkemizde toplam nar üretimi 127.760 tondur. Türkiye'nin birçok ilinde nar yetiştiriciliği yapılmaktadır. 52.963 tonluk nar üretimiyle Türkiye'de en fazla yetiştiriciliğin yapıldığı il Antalya'dır. Bunu sırasıyla Muğla (10.412 ton), Denizli (9.465 ton), G. Antep (8.509 ton), Mersin (8.197 ton) takip etmektedir (Anonim, 2010). Taze veya meyve suyu olarak tüketilmesinin yanında çeşitli kısımlarından tanen, pektin, sirke, sitrik asit elde edilmekte, boya ve ilaç yapımında kullanılmaktadır (Onur, 1988). Ayrıca yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip olan nar kabuğu eski zamanlarda ve günümüzde solunum hastalıklarının tedavisinde kozmetikte tentür hazırlanmasında kullanılmaktadır (Tzulker ve ark., 2007).

Aril olarak adlandırılan narın yenilebilir taneleri, meyve ağırlığının % 52 sini oluşturmaktadır. Ariller % 78 oranda nar suyu % 22 oranda da iç çekirdekten oluşmaktadır (Gültekin ve ark., 2007).

Kanser gelişme sürecini ifade eden ve başlangıç, ilerleme ve gelişme aşamalarını kapsayan karsinogenesis, yaş, beslenme alışkanlığı, hormonal denge gibi bir çok değişkenden büyük ölçüde etkilenen çok aşamalı bir süreçtir (Syed ve ark., 2007).

İlerlemiş kanserler için tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden kanser riskini azaltmak için uygulanabilir ve sonuç getirebilecek stratejiler üzerine yaklaşımlar geliştirilmektedir. Nitekim, doğal veya sentetik olarak elde edilmiş maddeler ile kanser gelişimini durdurma, oluşmuş kanseri normale döndürme ya da kanser gelişimini engelleme olarak tanımlanan kemoprevansiyon hızla gelişen bir alandır (Syed ve ark., 2007).

Gıdalarda bulunan kemoprevantif bileşikler hücre savunması ve hücre ölümü mekanizmalarını düzenleyerek karsinogenesis sürecini engellediğini ortaya koyan *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışma mevcuttur (Sun ve ark., 2002;. Ollson ve ark., 2004). Bu yüzden kanser riskini düşüreceği tahmin edilen gıdalara yönelim giderek artmaktadır. Birbirini doğrulayan birçok epidemiyolojik çalışma, meyve sebzelerin çok tüketilmesinin kansere yakalanma oranını azalttığını göstermiştir (Dragsted ve ark.,1993; Birt ve ark., 2001). Bunun sonucu olarak meyve ve sebzelerin kanserden koruyucu etkisinin nedenini anlamak ve antikarsinogenik etkiye sahip bileşenleri bulmak merak konusu olmuştur. Bitkide antioksidatif etkiye sahip bileşikler (fenolik maddeler, vitaminler vb.) ve bu bileşikler içinde de fenolik maddeler önemli sayılmaktadır

Bu tez kapsamında;

1. Ticari öneme sahip Hatay Hicaz, Adana, Antalya nar çeşitlerinin toplam fenolik, flavanoid ve antosiyanin miktarları belirlenmiştir.
2. Nar çeşitlerinin toplam antioksidan aktivitesi ve *in vitro* şartlarda HepG2 hücreleri üzerine (insan karaciğeri kanser hücresi) antiproliferatif aktivitesi (hücrelerin çoğalmasını engelleme) ölçülmüştür.
3. Son olarak da nar çeşitlerinin toplam fenolik, flavanoid ve antosiyanin miktarları ile antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri arasındaki korelasyonlar belirlenmiş ve fenolik madde kompozisyonunun antioksidan ve antiproliferatif aktiviteye etkisi istatistiksel olarak gösterilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Fenolik Bileşikler

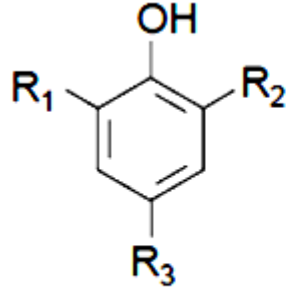
Fenolik bileşikler bitkilerin sekonder metabolitleri (ikincil metabolitler) olarak sentezlenen ve çeşitli kimyasal yapılarda bulunan biyoaktif maddelerdir. Bitkilerde fotosentez ile oluşan karbonun yaklaşık % 2'si fenolik bileşiklere dönüşür. Bu doğal maddeler bitkide biyotik ve abiyotik stres koşullarında sentezlenir ve bitkiyi bu stres faktörlerinin oluşturduğu olumsuz etkilere karşı korur. Fenolik bileşikler aynı zamanda bitkisel gıdalarda renk, aroma oluşumunu sağlama ve hücre içinde oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu (yağ, vitamin, ve enzimler) önleme gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Harborne ve Williams, 2001; Yao ve ark., 2004; Martens ve Mithöfer, 2005).

Fenolik bileşikler kimyasal olarak en az bir aromatik halka (bir halka içerenler fenol, daha fazla içerenler ise polifenoller olarak isimlendirilirler), yer değiştiren hidroksil grupları ve onların türevlerinin (glikozitler ve esterler) bulunduğu bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Fenolik bileşikler molekül ağırlıklarına göre genel olarak iki gruba ayrılır (Hattenschwiler ve ark., 2000):

1. Düşük molekül ağırlıklı bileşikler (fenolik asitler, flavanoidler)
2. Yüksek molekül ağırlıklı oligomerler ve polimerler

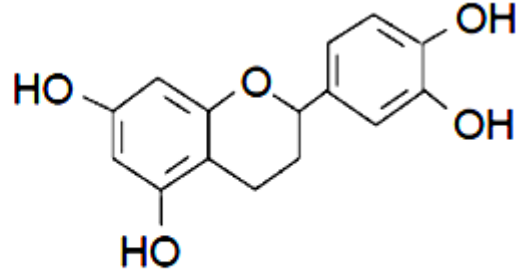
Yüksek molekül ağırlıklı fenolik bileşik olan tanenler, protein ve polisakkarit gibi diğer bitkisel polimerlerle bileşik oluşturabilen, monomer yapılı flavan-3-ol bileşiklerinin C4-C8 veya C4-C6 şeklinde interflavan bağı ile bağlanmasıyla oluşan polimer yapılı bileşiklerdir. Tanenler molekül ağırlığı 500 ve 3000 dalton arasında değişen suda çözünebilir fenolik bileşikler olarak tanımlanır. Kondanse ve hidrolize olabilen tanenler olarak iki önemli yapısal gruba ayrılır (Hattenschwiler ve ark., 2000).

Düşük molekül ağırlıklı bileşikler
[basit fenoller (C_6) Fenolik asitler
(C_5C_3) ve flavanoidler ($C_6C_3C_5$)



Çeşitli fenolik bileşikler

Yüksek molekül ağırlıklı oligomerler ve
polimerler (tanenler)



Flavan-3-ol kondanse
tanenlerin monomeri

Şekil 2.1 Fenolik bileşiklerin iki ana grubu (Hattenschwiler ve ark., 2000)

Hidrolize olabilen tanenler, fenol asitleri ve türevlerinin karbonhidratlarla oluşturduğu esterlerdir. Karbonhidrat molekülü genellikle glikozdur. Hidrolize olabilen tanenler grubunda yer alan gallotanen ve ellajik tanen, asit hidrolizi sonucunda gallik asit ve ellajik asite parçalanmaktadır (Hattenschwiler ve ark., 2000; Ribéreau-Gayon ve ark.,2000).

Kondanse tanenler ise flavan-3-ol veya kateşinlerin polimerizasyonu sonucu oluşan kompleks yapılu bileşiklerdir. Kondanse tanenler asit ortamında ısıtıldıklarında kırmızı renkli siyanidinler oluşmaktadır. Bu nedenle kondanse tanenlere ‘prosiyanidinler’ veya ‘lökosiyanidinler’ de denmektedir Prosiyanidinler hemen hemen suda çözülmez ve yaklaşık 7000 dalton (20 flavan-3-ol üzerinde unite) molekül ağırlığındadır (Hattenschwiler ve ark., 2000; Ribéreau-Gayon ve ark.,2000).

Bitkilerde fenilalaninden fenilpropanoid yolu ile oluşan bu doğal ürünlerin farklı kimyasal yapıda binlerce çeşidi tanımlanmıştır (Shirley 2001). Şekil 1 de görüleceği gibi fenolik bileşiklerin biyosentezi birçok enzimatik adımı kapsar. Fenol bileşikleri benzen halkalarından oluşmuştur. Benzen halkaları ise pentoz fosfat yolundaki ürünlerden eritroz 4-fosfatın kondenzasyonu sonucu oluşur. Şikimik asit yolu olarak tanımlanan bu biyosentetik yoldan ürün olarak, aromatik karakterli benzoik ve sinnamik asitler meydana gelir. Glikoliz yolunda ise şekerler

Polifenollerin genel biyosentez yolu tamamen tanımlanmasına rağmen bitki dokularındaki polifenollerin özelliğini ve miktarını belirleyen düzenleyici ve kontrol faktörleri tartışmalı alanlardır. Bu durum düzenleyici faktörlerin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Genotipe özgü faktörlerle dış çevresel faktörlerin (sıcaklık, UV vb.) birbiriyle etkileşimi sonucunda türler arasında ve içinde fenolik madde içeriğinde farklılık oluşmaktadır (Hattenschwiler ve ark., 2000).

2.2. Narın Kimyasal Bileşimi

Narın kimyasal kompozisyonu çeşide, yetiştirildiği bölgeye, iklim, olgunluk, tarımsal uygulamalar ve depolama şartlarına göre farklılık gösterir. Bir çok araştırmacı tarafından farklı zamanlarda yapılan analizlerde narların organik asit, fenolik bileşikler, şekerler, suda çözünür vitaminler ve minerallerin kompozisyonunda önemli farklılıklar bulunmuştur (Poyrazoğlu ve ark., 2002; Özgen ve ark., 2008; Tezcan ve ark., 2009). Nar suyunun bazı özelliklerine ait veriler çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Narın bazı analitik ve kimyasal özellikleri

Özellikler	Miktarlar	Kaynak
pH	(2.98–3.63), (3.29–3.93)	
Çözünür kuru madde % (°Briks)	(14.7–17.9), (16–19)	Özgen ve ark., 2008; Poyrazoğlu ve ark., 2002
Titrasyon asitliği (sitrik asit, g/L)	(5–24), (4.5–17.3)	
Sitrik asit (g/L)	(2–32), (0.33–7.08)	
Malik asit (g/L)	(0.9–1.5), (0.56–6.86)	
Askorbik asit (g/L)	0.14–0.69	Özgen ve ark., 2008;
Sakkaroz (g/L)	0.2–0.4	
Glikoz (g/L)	(58–76), (39.8–69.1)	Özgen ve ark., 2008; Tezcan ve ark., 2009
Fruktoz (g/L)	(58–70.6), (45.5–69.9)	
Toplam şeker (g/L)	(116–143), 139.6–160.6)	Özgen ve ark., 2008; Poyrazoğlu ve ark., 2002)
Potasyum (mg/kg)	809–2251	Vardin,2000
Kalsiyum (mg/kg)	1.5–207	
Sodyum (mg/kg)	4.41–45.8	
Demir (mg/kg)	3.75–17.1	

Nar, fenolik asitler (gallik asit, ellajik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, ferulik asit ve kumarik asit) flavonoidler (antosiyenin, kateşinler, ve

diğer kompleks flavonoidler) ve hidrolize olabilen tanenler (punicalin, punicalajin, gallajik ve ellajik asitin glikoz esterleri) gibi birçok fenolik bileşik için zengin bir kaynaktır. Hidrolize olabilen tanenler narın antioksidan aktivitesinin yaklaşık % 92'sini oluşturmaktadır. Narda bulunan bazı hidrolize olabilen tanenlerin kimyasal yapısı şekil 2.3' de verilmiştir (Gil ve ark., 2000; Poyrazoğlu ve ark., 2002).

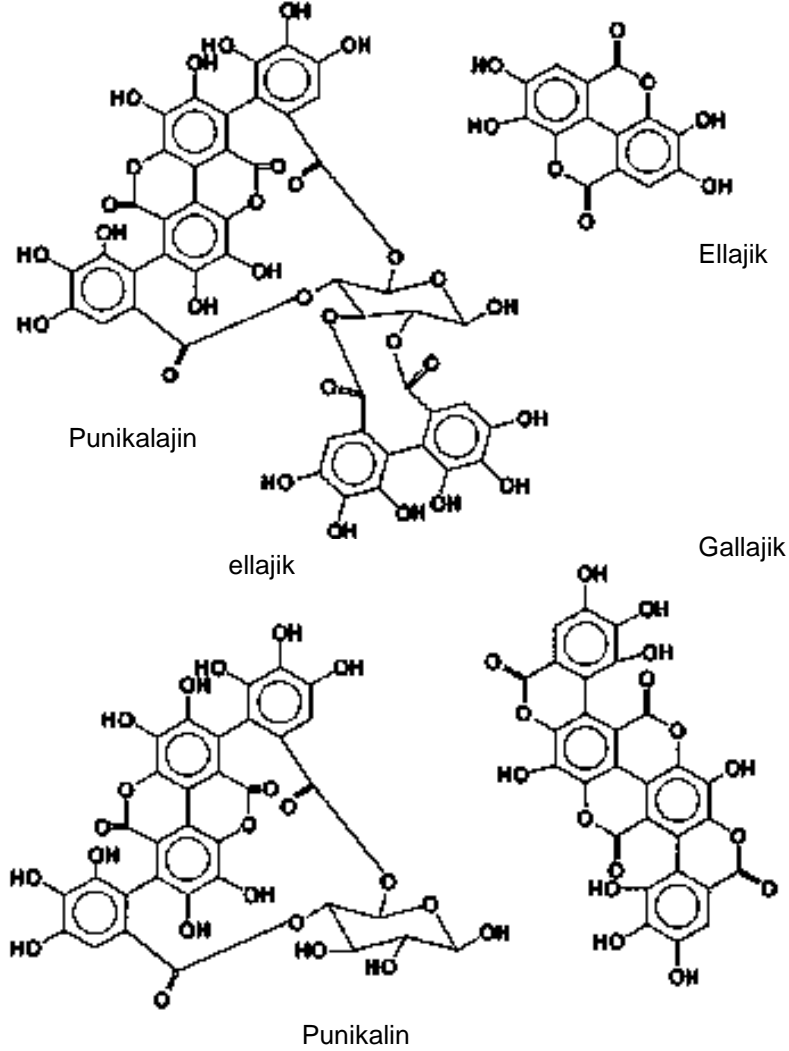
Narda bulunan antosiyanidinler flavan-3-ol hariç diğer flavanoidlerden yapısal olarak farklıdır. karbon halkasında karboksil grubu içermez ve hücrede veya lipozom membranında lipit peroksidasyonunu önleme yeteneğindedir (Syed ve ark., 2007) .

Nar özellikle meyveye karakteristik rengini veren antosiyaninlerce zengindir Delfinidin siyanidin pelargonidin içeriğiyle önemli bir antosiyanin kaynağı olup bu üç antosiyanidin lipit peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir (Gil ve ark., 2000; Syed ve ark., 2007).

Nar çekirdeği çoklu doymamış yağ asitleri şekerler, vitaminler, polisakkaritler, polifenoller, minerallerce zengin ve yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Kurutulup ezildiğinde nar çekirdeği yağı elde edilir ve kozmetik sanayinde kullanılır Yağın bileşiminde, nar çekirdeğine özel konjuge linolenik asit olan punisik asit bulunmaktadır. Bu yağ, % 80'i punisik asit olmak üzere 18 karbonlu yağ asitleri (linoleik, palmitik asit, oleik asit) ve izoflavon genistein içermektedir (Syed ve ark., 2007) .

Gil ve ark. (2000), nar suyu, yeşil çay ve kırmızı şarabın fenolik bileşik miktarını ve antioksidan aktivitesini ölçmüşler. Nardaki fenolik bileşik miktarı (2566 ± 131 mg/L), kırmızı şarap (2036 ± 59) ve yeşil çaydan (1029 ± 36) yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca nar suyunun antioksidan aktivitesi (18 TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity), kırmızı şarap ve yeşil çaydan (6-8 TEAC) 3 kat fazla olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada ayrıca nar suyunun fenolik bileşikler 4 gruba ayrılarak HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile belirlenmiş ve her fenolik grubunun antioksidan aktiviteye katkısı incelenmiştir. Antosiyaninler, punikalajinler, ellajik asit türevleri ve hidrolize olabilen tanenler içinde punikalajin

grubu fenoliklerin yüksek konsantrasyonda bulunduğu görülmüştür. Nar suyunun antioksidan kapasitesini punikalajinleri de içine alan hidrolize olabilen tanenlerin belirlediği bulunmuştur.



Şekil 2.3 Narda bulunan hidrolize olabilen tanenlerin yapısı (Gil ve ark., 2000)

Poyrazoğlu ve ark. (2002), Adana, Antalya, Hatay ve Mersin illerinden alınan 13 farklı nar çeşidinden elde edilen işlenmemiş nar sularında 10 fenolik bileşik belirlemişlerdir. Bunlar, hidroksibenzoik asitler (gallik ve protokateşik asit), hidroksisünamik asitler (klorojenik, kafeik, ferulik, o- ve p- kumarik asitler, flavan-3-oller (kateşin), dihidroçalkonlar (floridzin), flavonoller (kuersetin)' dir.

Aviram (2002), nar suyu, kırmızı şarap, yeşil çay ve portakal suyunun toplam fenolik içeriğini ölçmüş ve en yüksek fenolik madde içeriğini narda tespit etmiştir.

Farklı meyve türlerinde (elma, ayva, üzüm, armut ve nar) yapılan çalışmada toplam fenolik ve flavonoid içeriğini ölçülmüştür. Toplam fenolik madde içeriği en yüksek ayvada bulunmuş bunu nar, üzüm, elma, armut izlemiştir. En yüksek antioksidan aktivitesinin ise narda olduğu görülmüştür (Karadeniz ve ark., 2005)

Akdeniz bölgesinden hasat edilen 6 çeşit arılden elde edilen meyve suyunda kimyasal ve antioksidan özelliklerine bakmışlardır. Bu özellikler toplam fenolik, toplam antosiyanin toplam çözünür madde, titre edilebilir asitlik, şeker ve organik asit içeriğini kapsamaktadır. Toplam fenolik miktarı 1245-2076 mg gallik asit eşdeğerinde gallik asit/ lve toplam antosiyanin içeriği 6,12- 219 mg siyanidin 3-glikozit eşdeğeri/ l arasında değişen değerler bulunmuştur. Toplam fenolik içeriği ile antosiyanin miktarı arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($r = 0.94$) . Antioksidan kapasitesi ile toplam fenolik madde arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada antosiyaninlerin antioksidan aktiviteye belirgin olarak katkısı saptanmıştır (Özgen ve ark., 2008).

Tzulker ve ark. (2007), antioksidan, toplam polifenol, toplam antosiyanin ve dört temel hidrolize olabilen tanen (punikalajin, ellajik asit, punikalın, gallajik asit) miktarını belirlemiştir. Bu çalışma arılden hazırlanan meyve suyu, bütün meyveden ve kabuktan elde edilen homojenatta yapılmıştır. Bütün meyveden yapılan homojenatın antioksidan aktivitesinin aril suyundan yaklaşık 20 kat, fenolik madde içeriğinin ise 6.5 kat fazla olduğu bulunmuştur. Homojenatların antioksidan aktivitesi dört temel tanenle orantılı bulunurken aril suyunun antioksidan aktivitesi toplam fenolik ve toplam antosiyanin seviyesi ile orantılı bulunmuştur. Aril suyunda antioksidan aktiviteye katkısı olan temel bileşiğin antosiyanin bileşikler olduğu öne sürülmüştür. Nar kabuğundan elde edilen homojenatın antioksidan aktivitesi, bütün meyve homojenatından 2 kat fazla olduğu bulunmuştur. Fenolik bileşik miktarı antioksidan seviyesi ile orantılı iken antosiyanin miktarıyla bir ilişki bulunamamıştır.

Seeram ve ark. (2008), Amerika Birleşik Devletlerinde yaygın olarak tüketilen fenolik bileşiklerce zengin içeceklerin (nar, elma, açayı, vişne, yaban mersini,

kızılcık ve üzüm suyu yeşil ve siyah çay) toplam fenolik ve antioksidan kapasitesine bakmışlardır. Toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasitesi aynı sıralamayı göstermiştir. İçecekler içinde en yüksek fenolik madde içeriğine sahip olan nar suyunun antioksidan aktivitesinin de yüksek olduğu görülmüştür. Nar suyunu sırasıyla kırmızı şarap, üzüm suyu, yaban mersini suyu, vişne suyu, açayı suyu, kıızılcık suyu, portakal suyu, elma suyu takip etmiştir.

Tezcan ve ark. (2009), bütün narın preslenmesiyle elde edilen yedi çeşit ticari nar suyunun toplam fenolik içeriğini, DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl) serbest radikalini tutma ve demir indirgeme kapasitesini ölçerek antioksidan aktivitesini belirlemişlerdir. Sonuçlar ticari nar suyunun arıldan elde edilen nar suyuna nazaran belirgin biçimde yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Toplam fenolik miktarını 2602–10086 mg/L değerlerinde bulmuşlardır. Antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik miktarı arasında pozitif korelasyon ($r > 0.98$) bulunmuştur.

2.3. Antioksidanlar ve Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren veya elektron kaybetmiş atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak adlandırılır. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda (mitokondriyal elektron transport zinciri gibi) ara ürün olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bir radikal olarak değerlendirilen moleküller oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer ve serbest oksijen radikalleri oluşur. Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek kısmi oksijen basıncı (PO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2^{\cdot}), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin, protein, karbonhidrat ve enzimlerine, membranlarındaki doymamış yağ asitlerine, hatta kromozomlara ve DNA'ya zarar verebilmektedir (Anonim 2011).

Fenolik bileşikler kimyasal yapıları itibariyle elektron vericileridir. Fenolik bileşiklerin halka yapıları ve hidroksil grupları, *in vitro* hücre kültüründe veya hücre içermeyen sistemlerde oksidasyon sürecinde antioksidan olarak görev yapar. Oksitleyici türlerle kompleks oluşturma veya hidrojenasyonla meydana gelen oksidasyon süreci; süperoksit anyonu, tekli oksijen, lipid peroksit radikallerinin, temizlenmesi veya serbest radikallerin stabilize edilmesini kapsamaktadır (Birt ve ark., 2001).

Hücrede oluşan ROS' u ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması (antioksidan enzimler, vitaminler, melatonin, sistein gibi) vardır. Ancak bazen (stres, toksinler, ilaçlar) hücrel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla ROS oluşabilir. Organizmada hücrenin savunma mekanizması tarafından ortadan kaldırıldandan daha fazla ROS meydana gelmesi oksidatif stres meydana getirmektedir. Oksidatif stres lipid peroksidasyonu kalp ve damar hastalıkları, kanser, kronik inflamatuvar ve DNA' nın oksidasyonu ile mutasyonlara neden olabilmektedir. Antioksidanlar oksidatif zararı engelleyerek dokuları korumaktadır (Birt ve ark., 2001; Hollman ve Katan, 1999).

Fenolik bileşikler serbest radikalleri nötrleme bakımından ideal bir kimyasal yapıya sahiptir. Bu bileşiklerin *in vitro* koşullarda E ve C vitamininden daha etkili antioksidan oldukları görülmüştür. (Çizelge 2.2, Rice-Evans ve ark., 1997).

Çizelge 2.2 Bazı fenolik bileşikler ve antioksidan vitaminlerin relatif toplam antioksidan aktiviteyi (Rice-Evans ve ark., 1997)

<i>Antioksidan</i>	<i>Antioksidan Aktivitesi mM</i>
C vitamini	1.0 ±0.22
E vitamini	1.0 ± 0.03
P- kumarik asit	2.2 ± 0.06
Siyanidin	4.4 ± 0.12
Delfinidin	4.4 ± 0.11
Kuersetin	4.7 ± 0.10
Kamferol	1.3 ± 0.08

TEAC (Trolox Equivalent Antioksidant Activity) 1 mM fenolik bileşiğin antioksidan aktivitesine eşdeğer Trolox konsantrasyonu

Sun ve ark. (2002) tarafından 11 farklı meyve türünün toplam fenolik madde içeriği ile toplam antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Fenoliklerin bu meyvelerin antioksidan aktivitesine katkısını belirlemek için C vitaminin toplam antioksidan aktivitesi içindeki payı ölçülmüştür (Çizelge 2.3). Çizelgede görüldüğü gibi meyveler içinde C vitaminin antioksidan aktivitesine katkısı % 8.6 ile % 0.35 arasında değişmektedir. C vitaminin antioksidan aktivitesine katkısı en yüksek greyfurtta en düşük kırmızı üzümde olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.3 Toplam antioksidan aktiviteye C vitaminin etkisi (Sun ve ark., 2002)

Meyve	C Vitamini		Toplam Antioksidan Aktivitesi (C vitamini cinsinden μmol)
	Antioksidan aktivitesi ($\mu\text{mol/g}$)	Top. Antioksidan Aktivitesine Etkisi %	
Elma	0.33	0.40	97.23
Üzüm	0.23	0.35	64.35
Çilek	2.11	3.28	61.08
Şeftali	0.38	0.76	48.69
Portakal	2.57	8.16	23.32
Greyfurt	2.11	8.57	16.09

Meyve ve sebzelerdeki toplam fenolik içeriği ile antioksidan aktivitesi arasında doğru orantı vardır. Dört ahududu çeşidinde toplam fenolik madde içeriği ile toplam antioksidan aktivitesi ölçülmüş toplam fenolik içeriği yüksek olan çeşidin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Liu ve ark., 2002).

2.4. Meyve Ekstraktlarının Kansere Hücrelerinin Çoğalmasına Etkisi

Oksidatif zarar kanserde başlangıç evresini ve hücrelerin çoğalmasını başlatabilir. Kansere hücrelerinin çoğalması kansere tümörünün ilerlemesinde önemlidir. Bütün tümörlerin yerleşmesi ve ilerlemesi, hücre çoğalmasını kontrol eden birkaç temel yolun düzenindeki bozulmayla olmaktadır. Düzensiz hücre

çoğalması ve hücre ölümünün azalması kanser oluşumu ve gelişimi için asgari şartları oluşturur (Olsson ve ark; 2004).

Katherine ve ark. (2003) bazı çilek çeşitlerinin toplam fenolik, flavanoid ve antosiyanin içeriğini belirlemişlerdir. Çilek çeşitlerinde toplam fenolik içeriğinin 100 gramda 273 mg ile 202 mg gallik asit eşdeğeri arasında değiştiği bulunmuştur. Çözünür serbest fenolik bileşik içeriği en yüksek olan çeşidin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Çilek ekstraktlarının kanser hücrelerinin çoğalmasını ekstrakt miktarıyla orantılı olarak engellediğini bulmuşlardır.

On farklı meyve ekstraktının kolon kanser hücrelerinin (HT29) ve bağırsak kanser hücrelerinin (MCF-7) çoğalması üzerine etkisi araştırılmıştır. Ekstraktlar doza bağlı olarak hem HT29 hücrelerinin hem de MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını azaltmıştır. Bu çalışmada kanser hücrelerinin çoğalmasının engelleme derecesinin C vitamini ve bazı karotenoidlerin (lutein, β karoten) seviyesi ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Hücre çoğalmasındaki engelleme derecesi tek başına standart askorbatla aynı bulunmamıştır. Bu da C vitaminin diğer maddelerle sinerjistik bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca bu meyvelerde bulunan antosiyanin içeriği ile MCF -7 hücrelerinin çoğalması arasında ters bir ilişki bulunmuştur. HT29 hücrelerin çoğalması ile antosiyanin konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunmamıştır (Olsson ve ark; 2004).

Vişne üzerinde yapılan bir araştırmada vişnedeki antosiyaninlerin farelerdeki tümör gelişmesini ve insanlardaki kolon kanser hücrelerinin büyümesini engellediği bulunmuştur (Blando ve ark., 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Harran ovasında yetiştirilen Hatay, Hicaz, Adana, Antalya nar çeşitleri kullanılmıştır.

Kimyasallar: Glukagon, insulin, hidrokortizon, metanol, 2.2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH), aseton, gallik asit, kateşin. Folin-Ciocalteu reagent, HCl, NaNO₂, AlCl₃, NaOH, HepG2 karaciğer kanser hücresi, The Cell Titer 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay.

3.1.1. HepG₂ insan karaciğer hücreleri

Hep G2 hücreleri, ilerlemiş karaciğer kanseri olan 15 yaşında erkek bir Amerikalının karaciğer dokularından alınmıştır.

Hep G2 karaciğer kanseri hücresi, nude mice'da (timusu alınmış, immunitesi suprese edilmiş farelerde) tumor oluşturmayan fakat yarı sıvı besiyerinde koloni oluşturan yapısal olarak epithelyal olan hücrelerdir. Albumin, transferin, fibrinojen, gibi önemli plazma proteinleri sentezlemektedir. Üzerinde insulin büyüme faktör reseptörü bulundurmaktadır (Anonymous, 2011a).

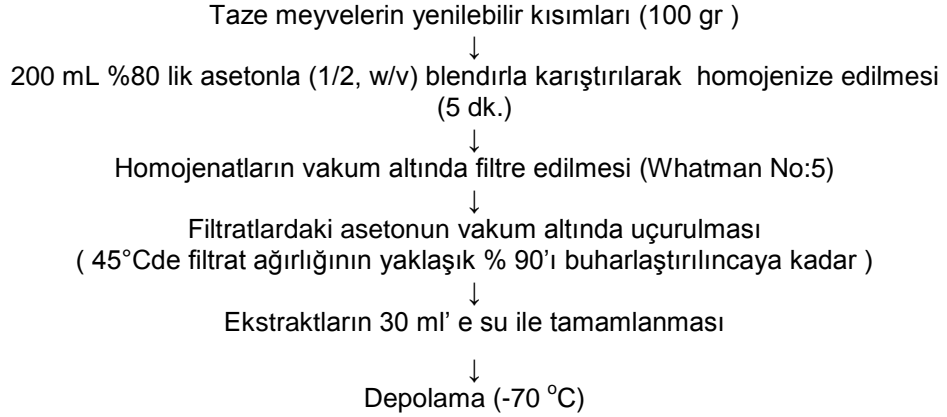
3.2. Yöntem

3.2.1. Narda uygulanan ön işlemler

Narların arilleri elle ayıklanmıştır. Her çeşitten 6 adet nar tanelenmiş, elde edilen arillerden 100 gr tartılmış ve ekstraksiyon işlemleri için kullanılmıştır.

3.2.2. Ekstraksiyon

. Ekstraksiyon her nar çeşidi için 3 paralelli olarak yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi Sun ve ark. (2002)' a göre gerçekleştirilmiştir.(Şekil 3.1). Ekstraktlar kullanılmaya kadar -70°C ' de depolanmıştır.



Şekil 3.1 Ekstraksiyon akış şeması

3.2.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Narın toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir. Metot meyve ekstraktlarının FCR (Folin – Ciocalteu reagent) ile okside edilmesi daha sonra ise reaksiyonun sodyum karbonatla nötrale edilmesi esasına dayanır.

Nar ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri Slinkard ve Singleton (1977) metodunun modifikasyonu ile belirlenmiştir. (0.03 ml nar ekstraktı alınıp üzerine sırasıyla 2.370 ml dH₂O ve 0.15 ml FCR ayracı eklenmiştir. Yaklaşık 8 dk sonra karışımlara doymuş Na₂CO₃ (0.45 ml) ilave edilip karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 30 dk bekletilip absorbans değerleri 760 nm'de okunmuştur. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak miligram cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.4. Toplam flavanoid içeriğinin belirlenmesi

Nar örneklerinin Flavanoid içeriği kolorimetrik metot kullanılarak ölçülmüştür (Zhishen ve ark., 1999; Liu ve ark.,2002).

0.5 ml nar ekstraktları 2.5 mL distile su ile karıştırılıp üzerine 150 µl %5 lik NaNO_2 çözeltisi eklenerek 6 dk. bekletilmiştir. 300 µl %10 luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilavesinden 5 dakika sonra 1 mL 1 M NaOH eklenmiştir. Distile suyla 5 mL'ye tamamlanmış ve hemen referansa karşı 510 nm de okunmuştur. Sonuçlar kateşin çözeltisiyle hazırlanan kateşin standart eğrisine göre hesaplanmış kateşin cinsinden miligram/ 100 g nar olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. Antosiyanin içeriğinin belirlenmesi

3.2.5.1. Doğal nar spektral eğrisinin belirlenmesi

Antosiyanin analizlerinde örneğin hangi dalga boyunda maksimum absorbans verdiği bilinmesi gerekmektedir (Cemeroğlu ve Artık,1990). Bu nedenle, ilk olarak nar için, 1 cm optik yollu küvette 350-700 nm arasında absorbans taraması yapılarak, spektral eğri ve maksimum absorbanslar belirlenmiştir. Bu çalışmada maksimum absorbans değeri 515 nm bulunmuştur.

3.2.5.2. Toplam antosiyanin tayini

Antosiyanin pigmentleri indikatör davranışı göstererek, pH 1.0 iken kuvvetli renkli oxonium yada flavilium formunda, pH 4.5 iken ise renksiz karbinol formunda bulunmaktadırlar (Wroslad,1976). Bu özellikten yararlanarak, Wroslad'ın ifade ettiği şekilde pH diferansiyel metoduna göre toplam antosiyanin analizi yapılmıştır. Bu amaçla nar suyu örneği tampon çözeltiler kullanılarak pH 1.0 ve 4.5'e ayarlanmıştır. Bu iki çözeltinin belirlenen maksimum dalga boyundaki absorbans farkı, antosiyanin içeriği ile orantılıdır. Bulanıklık faktörü tamponlanmış çözeltilerin 700 nm deki absorbanslarının maksimum absorbanslarından çıkartılması ile etkisiz hale getirilerek ve aşağıda verilen formüle göre absorbans farkları (**A**) bulunmuştur.

$$A = [A_{\max}(\text{pH}1.0) - A_{700}(\text{pH}1.0)] - [A_{\max}(\text{pH}4.5) - A_{700}(\text{pH}4.5)]$$

Burada bulunan **A** değeri verilen ikinci formülde yerine konularak, antosiyanin miktarı mg/l olarak tespit edilmiştir.

$$\text{Antosiyanin (mg/l)} = \frac{A \times 103 \times MW \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\Sigma \times L}$$

MW ; antosiyaninin molekül ağırlığı

Σ ; antosiyaninin molar absorpsansı

L ; küvet optik yolu (1 cm)

3.2.6. Toplam antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Nar ekstraktlarının serbest antioksidan kapasiteleri, Blois (1958) tarafından önerilen DPPH (.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)metodu ile ölçülmüştür.

Yöntem esas olarak DPPH' in etanol / metanolla hazırlanan çözeltisi üzerine antioksidan bileşiğin eklenmesi ve çözeltilde meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanmaktadır Koyu mor renkli DPPH çözeltisi antioksidan aktiviteye sahip ekstrakt ile karıştırılınca DPPH indirgenmektedir. Antioksidanların DPPH serbest radikalini indirgeme etkilerinin, bunların hidrojen (H) iyonu verme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir DPPH' in indirgenmesi sırasında koyu mor renk açılmakta ve sarı renk (DPPHH) oluşmaktadır. Antioksidan aktivitenin ölçülmesinde hızlı ve kolay olması nedeniyle tercih edilen kolorimetrik bir yöntemdir (Cemeroğlu, 2010).

DPPH yönteminde önemli bir parametre EC₅₀ (effective median concentration) değeridir. Antioksidan aktiviteyi hesaplamakta sıklıkla kullanılan bir yöntemdir Başlangıç DPPH. konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gereken örnek (antioksidan) konsantrasyonu olarak ifade edilmektedir. Düşük EC₅₀ değeri yüksek antioksidan kapasiteyi göstermektedir Yani EC₅₀ değeri ile antioksidan aktivite arasında ters orantı mevcuttur (Cemeroğlu, 2010).

Ekstraktlar etanol ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (250, 125, 50, 25, 10 ve 5 mg/mL) ekstrakt çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her ekstraktan 0.1 ml alınarak üzerine 2.9 mL DPPH (0.1 mM) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk. bekletildikten sonra absorbans değeri 517 nm’de ölçülmüştür. Ayrıca 2.9 mL DPPH çözeltisi ve 0.1 mL metanol eklenerek kontrol hazırlanır. Benzer şekilde oda sıcaklığında 30 dk bekletilir ve absorbans değeri ölçülür. Antioksidan aktivite değeri (AA) % olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

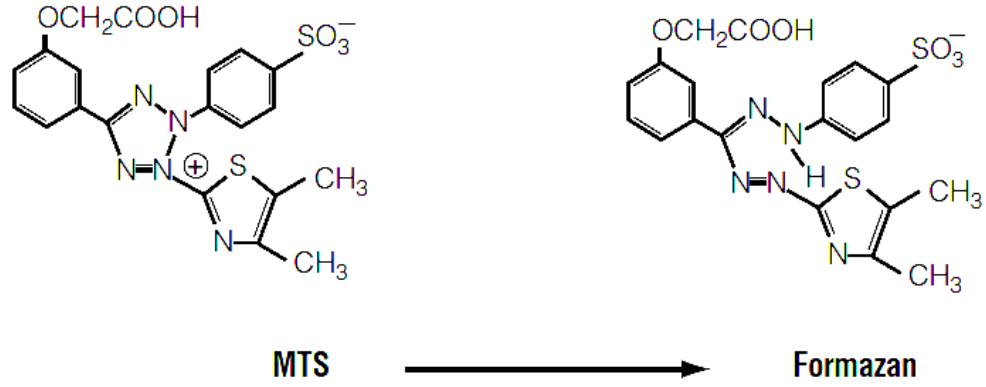
$$AA \% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{sample} - Abs_{referans}) \times 100]}{Abs_{kontrol}} \right\}$$

Her örnek için 3 paralelli olarak hesaplanan % AA değerlerinin ortalaması alınmıştır. Her nar çeşidi için değerlerin grafiği çizilerek lineer regrasyonla EC₅₀ değeri bulunmuştur.

3.2.7. Kanser hücrelerinin çoğalmasının ölçülmesi

HepG₂ kanser hücreleri WME (Williams medium E) ortamına ekilmiştir. Ortam 10 mM HEPES 5 µg/ml insülin, 2 µg/ml glukagon, 0.05 µg/ml hidrokortizon, % 5 fetal bovine serum içermektedir. HepG₂ hücreleri 37 °C de % 5 CO₂ ortamında 4 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra büyüme ortamı çeşitli konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL) nar ekstraktı içeren büyüme ortamıyla değiştirilmiştir. Kontrol, nar ekstraktı olmaksızın hazırlanan büyüme ortamındaki hücreler, referans ise hücresiz büyüme ortamı olarak kabul edilmiştir. Hazırlanan hücre kültürleri 96 saat inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücre çoğalması, her konsantrasyon için kontrole nazaran yüzde olarak MTS absorbansında (490 nm) belirlenmiştir. Ayrıca Nar ekstraktlarının antiproliferatif aktiviteleri EC₅₀ değeri olarak da ifade edilmiş ve besiyerinin her mililitresindeki miligram nar olarak gösterilmiştir. Düşük EC₅₀ değeri yüksek antiproliferatif aktiviteyi ifade etmektedir. Ölçüm işlemleri 3 paralel olarak yapılmıştır (Liu ve ark., 2002; Wolfe ve ark., 2003; Yang ve ark., 2004).

The Cell Titer 96® Non- Radioactive Cell Proliferation Assay çoğalan canlı hücreleri belirlemek için kolay ve hızlı bir kolorimetrik yöntemdir. Yöntemde yeni bir tetrazolyum bileşiği [3-(4,5- dimetiltiyazol-2-y-l)-5-(3-kaboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum, inner tuz; MTS] ve bir elektron bağlama ayracı fenazin metasülfat; (PMS) bulunmaktadır. MTS tetrazolyum bileşiği, doku kültür ortamında hücreler tarafından çözünebilen renkli formazan bileşiğine indirgenir (Şekil 3.1). Bu dönüşümü, metabolik olarak aktif olan hücrelerin NADPH veya NADH eşliğinde dehidrogenaz enzimleriyle sağladığı tahmin edilmektedir. Oluşan formazan 490 nm’ de maksimum absorbands vermektedir. 490 nm’de absorbands olarak ölçülen formazan miktarı kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Anonymous, 2011b).



Şekil 3.2. MTS tetrazolyum tuzunun yapısı ve formazana dönüşümü (Anonymous, 2011b)

3.2.8. Diğer bazı analizler

3.2.8.1. Nar sularında titrasyon asitliği tayini

Meyve suyundan 2 ml alınarak üzerine 20 ml damıtık su ilave edildi. 0.1N NaOH ile pH 8,1 olana kadar titre edilecektir. Sonuç aşağıdaki formül yardımı ile susuz sitrik asit cinsinden hesaplanmıştır (Cemeroğlu, 2010).

$$\text{Titrasyon asitliği (g/100ml)} = \frac{S \times N \times me \times F}{2} \times 100$$

S ; NaOH sarfiyatı
N ; NaOH'in normalitesi
me; Sitrik asit milieşdeğer ağırlığı(0.006404)
F ; Kullanılan NaOH'in faktörü

3.2.8.2. Nar sularında pH tayini

Cam elektrotlu Fisher Sci. model 10 (Denver, U.S.) marka pH metre ile Cemeroglu (2010)'a göre yapılmıştır.

3.2.8.3. Nar sularında suda çözünür kuru madde (Ç.K.M.) tayini

Suda çözünür toplam kuru madde miktarı masa tipi Abbe refraktometresi (Atago marka) ile 20 °C de doğrudan yüzde olarak belirlenmiştir (Gould, 1977).

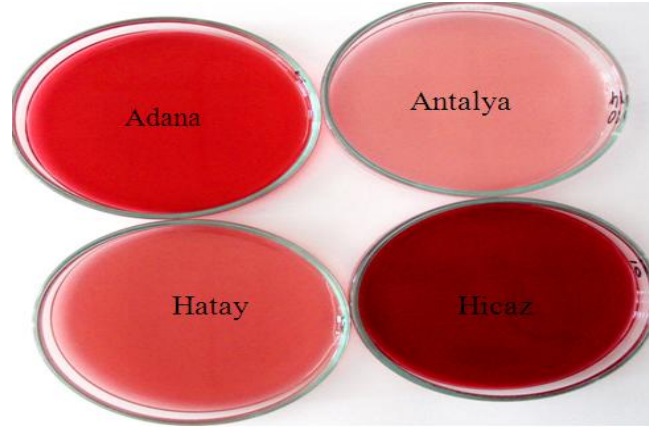
3.2.9. İstatistiksel analizler

İstatistik analizler SPSS 9.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Çeşitler arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ve LSD testi ile belirlenmiştir. Analiz parametreleri arasındaki korelasyonlar Minitap paket programı kullanılarak tespit edilmiştir. Bütün analizler üç paralelli yapılmış sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Toplam Çözünür Madde Asitlik ve pH değerleri

Üzerinde çalışılan nar çeşitlerinin pH, toplam asitlik %, briks değerleri çizelge 4.1 de verilmiştir. Toplam çözünür kuru madde miktarı (briks) en fazla Hicaz narında (19 ± 0.2) bulunmuş bunu sırasıyla Hatay (17.5 ± 0.2) Adana (17 ± 0.1) ve Antalya (16.5 ± 0.3) izlemiştir. Rengi en koyu Hicaz nar çeşidinin briksi en yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1). Kelebek ve Canbaş (2010) hicaz narında pH' ı 3.18 bulmuştur. Bu değer bizim bulduğumuz değerle örtüştüğü görülmektedir. Toplam % asitlik en yüksek Adana (2.46 ± 0.1) nar çeşidinde bulunmuş bunu sırasıyla Hicaz (1.78 ± 0.1), Hatay (0.45 ± 0.1) ve Antalya (0.37 ± 0.1) izlemiştir.



Şekil 4.1 Nar çeşitleri arasındaki renk farklılıkları

Çizelge 4.1 Nar çeşitlerinin bazı özellikleri (n=3)

Nar Çeşidi	Aril rengi	Briks	Top. Asitlik %	pH
Hicaz	Koyu kırmızı	19 ± 0.2	1.78 ± 0.1	3.20 ± 0.01
Adana	Kırmızı	17 ± 0.1	2.46 ± 0.1	3.10 ± 0.01
Hatay	Pembe	17.5 ± 0.2	0.45 ± 0.1	3.63 ± 0.02
Antalya	Açık Pembe	16.5 ± 0.3	0.37 ± 0.1	3.39 ± 0.02

4.2. Nar Çeşitlerindeki Fenolik Madde Miktarları

Nar çeşitlerindeki toplam fenolik madde içerikleri çizelge 4.2' de gösterilmiştir. Fenolik madde içeriğine çeşidin etkisi önemli bulunmuştur. Hatay nar çeşidinin en fazla fenolik madde içeriğine (337.41 ± 2.34 mg/ 100g) sahip olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla Adana (277.2 ± 3.69 mg/100 g) Hicaz (214.7 ± 2.63 mg/ 100g) ve Antalya (178 ± 1.8 mg/100 g) izlemektedir. Çeşitlerin fenolik madde miktarları istatistik olarak farklı ($p < 0.01$) bulunmuştur. Gil ve ark. (2000), taze arıdan elde edilen nar suyunda toplam fenolik içeriğini 211.7 mg/ 100 mL bulmuştur. Özgen ve ark. (2008) Akdeniz bölgesine ait 6 çeşit narda toplam fenolik madde içeriğini 124.5 - 207.6 arasında bulurken Çam ve ark. (2009), Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen 8 çeşit narın suyunda toplam fenolik içeriğini 208.3 – 343.6 mg/ 100 mL arasında bulmuştur. Ayrıca Kelebek ve Canbaş (2010), hicaz narında fenolik madde miktarını 228.6 ± 9.9 bulmuştur. Bu değerlerin analiz sonuçlarımıza yakın değerler olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2 Nar çeşitlerinin toplam fenolik madde, flavanoid ve antosiyanin içerikleri mg/ 100g meyve (n=3)

Nar Çeşitleri	Toplam fenolik	Toplam flavanoid	Antosiyanin
Hatay	337.4 ± 2.34^a	58.42 ± 2.25^a	4.369 ± 0.06^a
Adana	277.2 ± 3.69^b	54.33 ± 2.66^b	4.999 ± 0.07^b
Hicaz	214.7 ± 2.63^c	49.14 ± 2.05^c	6.296 ± 0.11^c
Antalya	178.0 ± 1.81^d	36.46 ± 0.91^d	1.368 ± 0.06^d

Çizelgede aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler birbirinden farklıdır ($p < 0.01$)

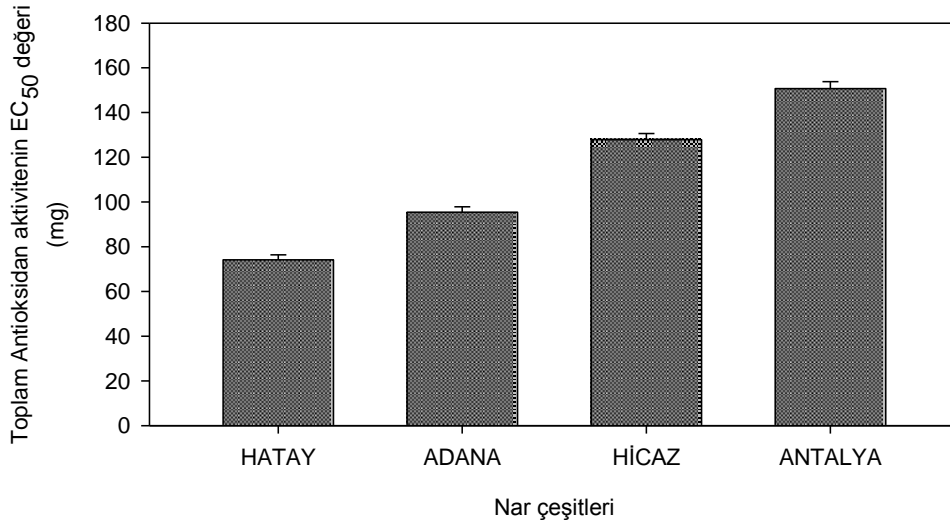
Nar çeşitlerinin antosiyanin içeriğine etkisi önemli bulunmuştur. Çeşitler içinde en yüksek antosiyanin içeriği Hicaz narda (6.269 ± 0.11 mg/ 100g) bulunmuştur. Bunu sırasıyla Adana (4.999 ± 0.07 mg/ 100g), Hatay (4.369 ± 0.057 mg/ 100g) ve Antalya (1.368 ± 0.06 mg/ 100g) izlemiştir. En düşük antosiyanin içeriği aril rengi sarı olan Antalya çeşidinde görülmüştür.

Toplam flavonoid içeriği en yüksek hatay çeşidinde (58.42 ± 2.25 mg/ 100 g) bulunmuş sırasıyla bunu Adana (54.33 ± 2.66 mg/ 100g) Hicaz (49.14 ± 2.05 mg/

100g) Antalya (36.46 ± 0.91 mg/ 100g) izlemiştir. Bu sonuçlar narın flavanoid içeriğine çeşidin etkisi olduğunu göstermektedir.

4.3. Nar Çeşitlerinin Antioksidan ve Antiproliferatif Aktiviteleri

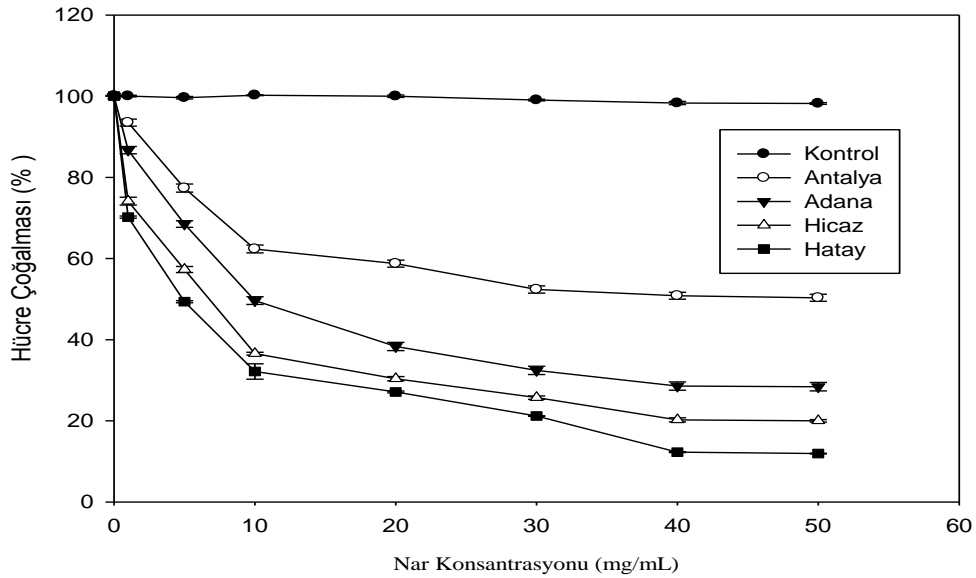
Toplam antioksidan aktivite sonuçları EC_{50} değeri olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.1) Ölçülen çeşitler içinde en düşük EC_{50} değeri 74.09 ± 2.32 mg Hatay çeşidinde görülmüştür. Bunu sırasıyla Adana (95.40 ± 46 mg) Hicaz (127.85 ± 2.73 mg) ve Antalya (150.74 ± 3.08 mg) çeşidi izlemiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek toplam antioksidan aktiviteye sahip olan çeşit Hatay en düşük antioksidan aktiviteye sahip çeşit de Antalya'dır. Çeşitlerin antioksidan aktivite değerleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Buna göre narların antioksidan aktivite değerlerine çeşidin etkisi önemlidir.



Şekil 4.2 Nar çeşitlerinin toplam antioksidan aktivitesinin EC_{50} değeri

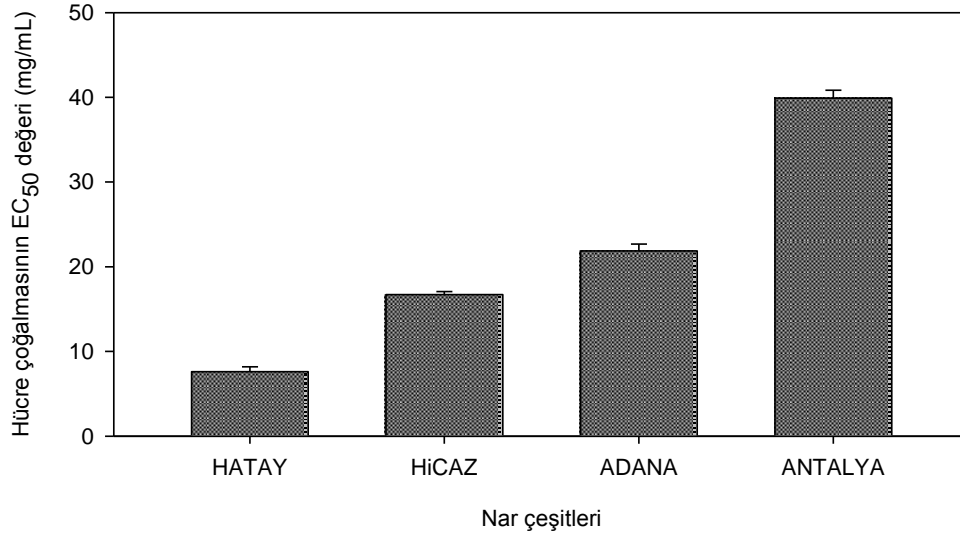
Konsantrasyonun 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/ mL olacak şekilde nar ekstraktı içeren besiyerinde HepG₂ hücreleri kültüre alındıktan 96 saat sonra hücre çoğalması MTS assay kullanılarak ölçülmüştür. HepG₂ hücrelerinin çoğalmasının nar ekstraktlarıyla muamele sonrası konsantrasyona bağlı olarak inhibe olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Nar çeşitlerinin tümü antiproliferatif aktivite göstermiştir. Benzer şekilde Ollson ve ark. (2004), çeşitli meyve ekstraktlarının HT29 ve MCF-7

hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmesinin konsantrasyona bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bir çok çalışmada Meyve ekstraktlarının HepG₂ hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Liu ve ark., 2002; Sun ve ark., 2002; Meyers ve ark., 2003). Nar çeşitlerinin 50 mg/ mL de antiproliferatif aktiviteleri sırasıyla Antalya 49.67±0,85 Adana 71.59±1.03 Hicaz 80.01±0.3 Hatay 88.07± 0.12 bulunmuştur. Çeşitler içinde 50 mg/ mL’ de en yüksek antiproliferatif aktiviteyi Hatay çeşidi en düşük aktiviteyi de Antalya çeşidi göstermiştir. Nar çeşidinin hücrelerin inhibisyonuna etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.01).



Şekil 4.3 Nar ekstraktlarıyla muamele edilen HepG₂ hücrelerinin çoğalma inhibisyon yüzdesi

Nar çeşitlerinin antiproliferatif aktiviteleri EC₅₀ değeri olarak gösterilmiştir (Şekil 4.4). En düşük EC₅₀ değeri en yüksek antiproliferatif aktiviteyi göstermektedir. Çeşitlerin EC₅₀ değerleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.01). Nar çeşitlerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla (Antalya 41.71 ± 0.81 mg/ mL), Adana 18, 37 ± 0.40. Hicaz 11.24 ± 0.78, Hatay 7,8 ± 0.35 bulunmuştur. Buna göre çeşitler içinde en yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip çeşit Hatay’ dır.

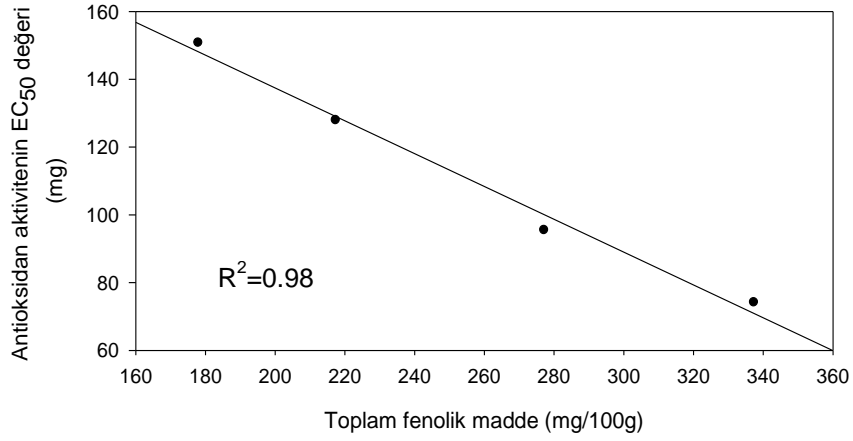


Şekil 4.4 Nar ekstraktlarının antiproliferatif aktivitenin EC₅₀ değeri

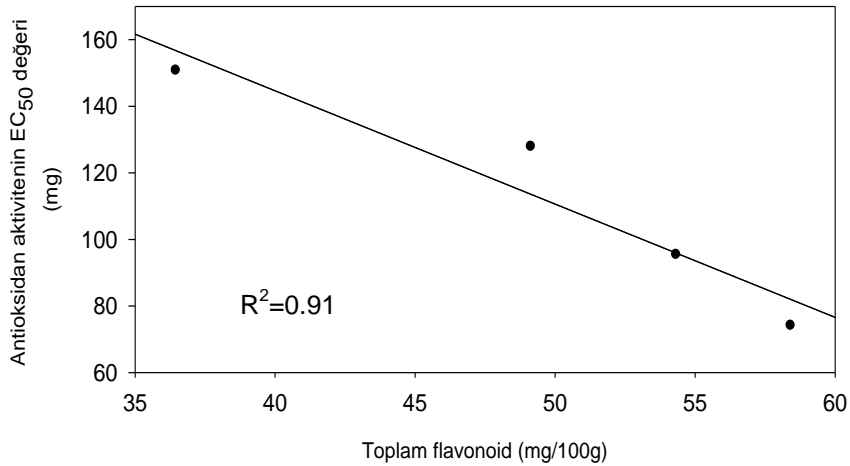
4.4. Nar Çeşitlerinin Fitokimyasal Miktarları ile Antioksidan Aktiviteleri Arasındaki İlişki

Nar çeşitleri içinde aril rengi sarı olan Antalya' nın toplam fenolik, antosiyanin, ve flavanoid miktarı en az bulunmuştur. Ayrıca antioksidan aktivitesi de en düşüktür. Bu durum nar çeşitleri içinde aril renginin, fenolik madde içeriğini ve antioksidan kapasitesini tahmin etmede bir gösterge olabileceğini göstermektedir.

Nar çeşitlerinin fenolik madde içeriği ile toplam antioksidan aktivitenin EC₅₀ değeri arasında negatif bir ilişki ($R^2 = 0.98$, $p < 0.01$) bulunmuştur (Şekil 4.5). Benzer şekilde toplam flavanoid içeriği ile narların antioksidan aktivitesinin EC₅₀ değeri arasında da ters orantı mevcuttur (Şekil 4.6). Bu durum fenolik madde ve flavanoid miktarı en fazla olan nar çeşidinin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde bir çok çalışmada toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasında yüksek regrasyon bulunmuştur (Tzulker ve ark., 2007; Liu ve ark.,2002).



Şekil 4.5 Nar çeşitlerinin toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivitesinin EC₅₀ değeri arasındaki ilişki



Şekil 4.6 Nar çeşitlerinin toplam flavonoid madde miktarı ile antioksidan aktivitesinin EC₅₀ değeri arasındaki ilişki

Dört nar çeşidinin analiz sonuçlarına göre Pearson'ın korelasyon katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Toplam fenolik ve Antioksidan aktivite ($r = -0.98$), toplam flavonoid ve antioksidan aktivite ($r = -0.92$) arasındaki korelasyon istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Bu sonuçlara göre nar çeşitlerinin toplam antioksidan aktivitesine, toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin önemli etkisi olduğunu göstermektedir. Antosiyanin içeriği ile antioksidan aktivite arasında korelasyon ($r = -0.45$, $p > 0.05$) önemsiz bulunmuştur. Çam ve ark. (2009)

antosiyenin madde içeriği ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyonu önemli bulmuştur. Fakat Tzulker ve ark. (2007)'nin 29 nar çeşidinde yaptıkları çalışmada bütün narı blendırda çekerek elde ettiği homojenatın toplam antioksidan aktivitesi ile fenolik madde miktarı arasındaki korelasyonu yüksek ve önemli bulmuş ($r= 0.95$, $p< 0.01$) antosiyenin içeriği ile korelasyonunu ise önemsiz ($p<0.05$) bulmuştur. Yine aynı çalışmada arıdan elde edilen nar suyunda DPPH metodu ile bulunan antioksidan aktivite değeri ile antosiyenin içeriği arasındaki korelasyon önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$).

Çizelge 4.3 Analiz parametreleri arasındaki korelasyon değeri (r)

	Antioksidan Aktivite (EC ₅₀)	Toplam Fenolik	Toplam Antosiyenin	Toplam Flavanoid
Toplam Fenolik	-0.98**			
Toplam Antosiyenin	-0.45	0.37		
Toplam Flavanoid	-0.92**	0.91 **	0.68	
Hücre Çoğalması (EC ₅₀)	0.83 **	-0.82 **	-0.75 **	-0.90**

Önemlilik $P<0.05$ ise * $p<0.01$ ise ** kullanılmıştır.

4.5. Nar Çeşitlerinin Fitokimyasal Miktarları ile Antiproliferatif Aktiviteleri Arasındaki İlişki

Nar ekstraktlarının tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe edip etmediğini belirlemek için HepG₂ insan karaciğer hücrelerinin besiyerine nar ekstraktları eklenmiştir. Sonuçlar tüm nar çeşitlerinin kontrole göre hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiğini ($p< 0.01$) göstermektedir. Hücre çoğalması ile toplam fenolik ($r= -0.82$), flavonoid ($r= 0.90$) ve antosiyenin ($r= -0.75$) madde miktarı arasındaki korelasyon istatistik olarak önemli ($p< 0.01$) bulunmuştur. Ayrıca hücre çoğalması ve antioksidan aktivite ($r= 0.83$) arasındaki korelasyonun istatistik olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p< 0.01$). Bu sonuçlara göre *in vitro* da tümör hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonuna toplam fenolik, flavanoid ve antosiyenin içeriğinin etkisi önemli görülmektedir. Seram ve ark (2005) nar suyu ve onun fenol bileşikleri üzerinde yaptığı çalışmada antioksidan aktivitesi yüksek olan nar suyunun en yüksek

antiproliferatif aktivite gösterdiğini bulmuştur. Bu çalışmada ise analiz sonuçlarına göre en yüksek antioksidan aktiviteye sahip çeşit, tümör hücrelerinin çoğalmasını en fazla inhibe etmiş; düşük antioksidan aktiviteye sahip çeşit hücrelerin çoğalmasını en düşük düzeyde inhibe etmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Nar meyvesinin bazı fenol bileşiklerinin ve toplam fenolik miktarının antioksidan aktiviteye ve kanser hücrelerinin çoğalmasına etkisi araştırılmış ve bu çalışma sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Narların (Adana, Antalya, Hatay ve Hicaz çeşitleri) toplam antosiyanin, flavanoid ve fenolik madde miktarını çeşidin önemli düzeyde ($p < 0.01$) etkilediği görülmüştür.
2. Narların toplam fenolik madde miktarlarıyla antioksidan aktivitesi arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($r=0.98$). Buna göre nar çeşitleri içinde, toplam fenolik madde miktarı en fazla olan ($337,41 \pm 2.34$) Hatay çeşidinin yüksek, fenolik madde miktarı en az olan Antalya çeşidinin düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.
3. Flavanoid miktarının antioksidan aktiviteye etkisi önemli bulunurken ($p < 0.01$) antosiyanin miktarının etkisi önemsizdir ($p > 0.05$). Diğer çalışmalar da göz önüne alınırsa nar da antioksidan aktiviteyi belirleyen temel unsurların tanenler ve flavanoidler olduğu söylenebilir.
4. HepG2 hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonunda nar çeşitlerinin etkisi önemli ($p < 0.01$) bulunurken, inhibisyonun derecesinin ise nar ekstraktının besiyerindeki konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı bulunmuştur.
5. Nar çeşitlerinin toplam antosiyanin, flavanoid ve fenolik madde miktarı ile HepG₂ hücrelerinin çoğalması arasında yüksek korelasyon (sırasıyla, $r=0.75$, $p < 0.01$; $r=0.90$, $p < 0.01$; $r=0.82$, $p < 0.01$) bulunmuştur. Buna göre nar çeşitleri içinde toplam fenolik madde ve flavanoid miktarı en fazla olan Hatay çeşidinin HepG₂ hücrelerine antiproliferatif aktivitesi en yüksek toplam fenolik madde ve flavanoid miktarı en az olan Antalya çeşidinin en düşük bulunmuştur.

6. Nar çeşitlerinin antioksidan aktivitesinin hücre çoğalmasına etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.01$). En yüksek antioksidan aktiviteye sahip çeşit olan Hatay'ın hücreler üzerindeki antiproliferatif aktivitesi en yüksektir.
7. Narda bulunan fenolik maddelerin antioksidan ve antiproliferatif aktiviteye önemli etkisi olduğu görülmektedir. Bu durum narın karsinogenesis sürecini yavaşlatabileceği anlamına gelmektedir. Bu yüzden nar tüketilmesi tavsiye edilebilir.

Bu çalışmanın eksik yönü *in vitro* bir çalışma olmasıdır. *In vitro* çalışmalar her zaman *in vivo* çalışmaların sonuçlarını vermez. Fakat *in vitro* araştırma sonuçları yapılacak hayvan ve insan araştırmalarına önemli yol gösterici çalışmalar olabilmektedir. Bu yüzden bu araştırmanın bundan sonraki araştırmalara referans olacağı düşünülmektedir.

Nar HepG₂ hücrelerinin çoğalmasını azaltmıştır fakat karsinogenesis çok aşamalı bir süreçtir. Bu yüzden ileriki araştırmalar için gen ekspresyonunda fenolik maddelerin rolünün incelenmesi önerilebilir. Ayrıca meyvede fenolik bileşiklerin kompozisyonu belirlenerek bireysel olarak hangi bileşiğin hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği araştırma konusu olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

- ANONİM, 2010. [www. tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul](http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul). (Erişim tarihi: Haziran, 2010).
- ANONİM, 2011. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>.
- ANONYMOUS, 2011a. Product Information Sheet for ATCC, HepG₂ ATCC Catalog No: HB-8065, [www. atcc.org](http://www.atcc.org)
- ANONYMOUS, 2011b. Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, www.promega.com/tbs.
- AVIRAM, M., 2002. Polyphenolic Flavonoids Content and Antioxidant Activities of Various Juices: A Comparative Study. Article in Pres
- BIRT D. F., HENDRICH, S., WANG, W.,2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmalogy and Therapeutics*, 90: 157-177
- BLANDO, F., GERARDI, C., NICOLETTI, I., 2004. Sour Cherry (*Prunus Cerasus L*) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 253-258.
- BLOIS, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by The Use of A Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- CEMEROGLU, B., 2010. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 674, Ankara.
- ÇAM, M., HIŞIL, Y., DURMAZ, G., 2009. Classification of Eight Pomegranate Juices Based on Antioxidant Capacity Measured by Four Methods. *Food Chemistry*, 112: 721-726
- DESCHNER, E. E., RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWARK, H. L., 1991. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12: 1193–1196.
- DOLL, R., 1990. An Overview of The Epidemiological Evidence Linking Diet and Cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49: 119-131.
- DRAGSTED, L. O., STRUBE, M.; LARSEN, J. C., 1993. Cancer-Protective Factors in Fruits and Vegetables: Biochemical And Biological Background. *Pharmacology Toxicology*, 72: 116-135.

EBERHARDT, M. V., LEE, C. Y., LIU, R. H., 2000. Antioxidant Activity of Fresh Apples. *Nature* 405: 903-904.

HATTENSCHWILER, S., VITOUSEK, P.M., 2000. The Role of Polyphenols in Terrestrial Ecosystem Nutrient Cycling. Elsevier Science L.td. *Tree*, 15: 238-243

HARBORNE, J.B. and WILLIAMS, C.A., 2001. Anthocyanins and Other Flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 310-333

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B., 1999. Dietary Flavonoids: Intake, Healthy Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 937-942

JEDINAK, A., FARAGO, J., PSENAKOVA, I., MALIAR, T., 2004. Approaches to Flavonoid Production in Plant Tissue Cultures, 59(6): 697-710

KARADENİZ, F., BURDURLU, H.S., KOCA, N., SOYER, Y., 2005. Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. *Turkish J. Agri. Forest.* 29: 297-303.

KELEBEK, H., and CANBAŞ, A., 2010. Hicaz Narı Şirasının Organik Asit Şeker ve Fenol Bileşikleri İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi. *Gıda*, 35(6): 439-444

LEE, J.; WATSON, R. R., 1998. Pomegranate: a role in health promotion and AIDS Nutrition Food and AIDS; Watson, R. R., Edition; CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 179-192.

LIU, M., LI, X.Q., WEBER, C., LEE, C.Y., BROWN, J., LIU, R.H., 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 2926-2930

LIU, R.H., EBERHARDT, M.V., LEE, C.Y., 2001. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Selected New York Apple Cultivars. *New York Fruit Quarterly* 10: 15-17

MARTENS, S., MITHÖFER, A., 2005. Flavones and Flavone Synthase. *Phytochemistry*, 66: 2309-2407

MEYERS, K. J., WATKINS, C.B., PRITTS, M.P., LIU, R.H., 2003. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6887-6892

OLLSSON, M. E., GUSTAVSSON, K., ANDERSSON, S., NILSSON, A., DUAN, R., 2004. Inhibition of Cell Proliferation *in Vitro* by Fruit and Berry Extract and Correlations with Antioxidant Levels. *Agricultural Food Chemistry*, 52: 7264-7271

ÖZGEN M., DURGAÇ C., SERÇE S., KAYA C., 2008. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111: 703-706.

PÉREZ-VICENTE A, GIL-IZQUIERDO A, GARCIA-VIGUERA C, 2002. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2308-2312

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S., 1998. Role Of Oxidative DNA Damage in Cancer İnitiation and Promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, 7: 9-16

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEAU., 2000. *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*. John Wiley and Sons Ltd., England

RICE-EVANS, C.A., 1997. Antioxidant Propeties of Phenolic Compound. *Trends in Plant Science Reviews*, 2: 152- 159

SEERAM, N. P., AVIRAM, M., ZHANG, Y., HENNING, S. M., FENG, L., DREHER, M., and HEBER, D., 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 1415–1422.

SEERAM, N. P., ADAMS, L. S., HENNING, S. M., NIU, Y., ZHANG, Y., NAIR, M. G., and HEBER, D., 2005. *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 İn Pomegranate Juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*;16: 360–367.

SHIRLEY, B. W., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.

SUN, J., CHU, Y. F., WU, X., LIU, R. H., 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449-7454.

SYED, D. N., AFAQ, F., MUKHTAR, H., 2007. Pomegranate derived Products for Cancer Chemoprevention. *Cancer Biology*, 377-385.

GÜLTEKİN M, ÖZÇOBAN D, KARAALİ A, 2007. Antioksidan kaynağı bir içecek: Nar suyu. *Dünya Gıda, Temmuz*: 85- 87.

POYRAZOĞLU E, GOKMEN V, ARTIK N, 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L*) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 15(5):567–575.

TEZCAN, F., GÜLTEKİN-OZGUVEN, M., DİKEN, T., OZCELİK, B., ERİM, F. B., 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic, Organic Acid And Sugar Content in Commercial Pomegranate Juices. *Food Chemistry*, 115: 873-877.

TZULKER, R., GLAZER, I., BARILAN, I., HOLLAND, D., AVIRAM, M., AMIR, R., 2007. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9559–9570.

VARDİN, H., 2000. Harran Ovasında Yetiştirilen Değişik Nar Çeşitlerinin Gıda Sanayinde Kullanım olanakları Üzerine Bir Çalışma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana 117s.

YANG, J., MEYERS, K. J., HEIDE, J.V.D., LIU, R.H., 2004. Varietal Differences in Phenolic Content and Antioxidant and Antiproliferative Activities of Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6787-6793

YAO, L.H., JIANG, Y.M., SHI, J., TOMAS-BARBERAN, F.A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S.S., 2004. Flavonoids in Food and Their Healthy Benefits. 113- 122

WROLSTAD, R.E. 1976. Color and Pigment Analyses In Fruit Products. In: *Agricultural Station Bulletin 624*, Oregon State University.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, M. W., 1998, The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxides Radicals. *Food Chemistry*. 64: 555–559.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Malatya'da doğdu. Ortaokul ve liseyi Malatya'da 2000 yılında tamamladı. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldu. Bir süre özel sektörde çalıştı. 2009 yılında Haran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

ÖZET

Meyve sebzelerdeki fenolik bileşiklerin insan sağlığı için önemli biyoaktif maddeler olduğu bilinmektedir. Nar fenolik bileşiklerce zengin bir meyvedir. Narın insan sağlığına etkilerini araştırmak için dört nar çeşidinin (Hatay, Adana, Hicaz, Antalya) antioksidan ve antiproliferatif aktivitesi ölçülmüş, toplam fenolik, flavanoid, ve antosiyanin miktarı belirlenmiştir. Ayrıca narda bulunan fenolik bileşiklerin narın antioksidan ve antiproliferatif aktivitesine etkisi araştırılmıştır.

Toplam fenolik ve flavanoid madde içeriği en yüksek Hatay çeşidinde (337.41 ± 2.34 mg/ 100g, 58.42 ± 2.25 mg/ 100g) belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Adana (277.2 ± 3.69 mg/ 100g, 54.33 ± 2.66 mg/ 100g) Hicaz (214.7 ± 2.63 mg/ 100g, 49.14 ± 2.05 mg/ 100g), Antalya (178 ± 1.81 mg/ 100g, 36.46 ± 0.91 mg/ 100g) çeşidi izlemiştir. Toplam antosiyanin içeriği en yüksek Hicaz nar çeşidinde (6.269 ± 0.11 mg/ 100g) belirlemiş ve sırayla Adana (4.999 ± 0.07 mg/ 100g), Hatay (4.369 ± 0.06 mg/ 100g), Antalya (1.368 ± 0.06 mg/ 100g) çeşidi takip etmiştir. Toplam antioksidan aktivite DPPH metodu kullanılarak ölçülmüştür. En yüksek antioksidan aktivite Hatay çeşidinde belirlenmiş bunu sırasıyla Adana Hicaz, Antalya çeşidi izlemiştir. Narın antiproliferatif aktivitesi HepG₂ insan karaciğer hücreleri kullanılarak *in vitro* koşullarda MTS yöntemiyle ölçülmüştür. En yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip çeşit Hatay olarak belirlenmiştir. Bunu sırayla Hicaz Adana, Antalya çeşidi izlemiştir.

Sonuç olarak narda bulunan toplam fenolik ve flavanoid miktarıyla narın antioksidan ve antiproliferatif aktivitesi arasında doğru orantı bulunmuştur ($p < 0.01$). Diğer bir ifadeyle toplam fenolik ve flavanoid miktarı fazla olan nar çeşidi yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite göstermiştir.

SUMMARY

Phenolic compounds in fruits and vegetables are known as to be the major bioactive compounds benefiting to human healthy. To study the health benefits of pomegranate Hatay, Adana, Hicaz, Antalya pomegranate varieties were evaluated for their total antioxidant and antiproliferative activities. The total amount of phenolics, flavonoids, anthocyanin for each of the pomegranate varieties was determined. Also the effect of phenolic compounds to antioxidant and antiproliferative activity of pomegranates were investigated.

The highest amount of phenolics and flavanoid was determined in Hatay pomegranate variety (337.41 ± 2.34 mg/ 100g, 58.42 ± 2.25 mg/ 100g) followed by Adana (277.2 ± 3.69 mg/ 100g, 54.33 ± 2.66 mg/ 100g), Hicaz (214.7 ± 2.63 mg/ 100g, 49.14 ± 2.05 mg/ 100g), Antalya (178 ± 1.81 mg/ 100g, 36.46 ± 0.91 mg/ 100g). The Hicaz pomegranate variety had a highest levels of anthocyanin (6.269 ± 0.11 mg/ 100g) than the other three pomegranate varieties followed by Adana (4.999 ± 0.07 mg/ 100g), Hatay (4.369 ± 0.06 mg/ 100g) Antalya (1.368 ± 0.06 mg/ 100g). Total antioxidant activity was measured using the DPPH assay. Hatay had the highest total antioxidant activity followed by Adana, Hicaz, Antalya. Antiproliferative activities were also studied *in vitro* using HepG2 human liver-cancer cells by MTS assay, Hatay had the highest antiproliferative activity of the varieties measured followed by Hicaz, Adana, Antalya.

To conclude, the antioxidant and antiproliferative activity of the pomegranates was directly related to the total amount of phenolics and flavonoids found in the pomegranate ($p < 0.01$). In other words the highest phenolic and flavonoid content of pomegranate varieties showed higher antioxidant and antiproliferative activity.