

**T.C.**  
**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KARADUT (*Morus nigra* L.) EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİ VE SERUM PARAOKSONAZI ARİLESTERAZ KATALAZ  
VE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS**

**Abdoulaye COULIBALY**

**ŞUBAT-2026**  
**GÜMÜŞHANE**



**T.C.**

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KARADUT (*Morus nigra L.*) EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİ VE SERUM PARAOKSONAZI ARİLESTERAZ KATALAZ  
VE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BLACK MULBERRY  
(*Morus nigra L.*) EXTRACTS ON ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND SERUM  
PARAOXONASE1 ARYLESTERASE CATALASE AND MYELOPEROXIDASE  
ENZYME ACTIVITIES**

**YÜKSEK LİSANS**

**Abdoulaye COULIBALY**

**ŞUBAT-2026  
GÜMÜŞHANE**



T.C.

GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

KARADUT (*Morus nigra L.*) EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİ VE SERUM PARAOKSONAZI ARİLESTERAZ KATALAZ  
VE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BLACK MULBERRY  
(*Morus nigra L.*) EXTRACTS ON ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND SERUM  
PARAOXONASE1 ARYLESTERASE CATALASE AND MYELOPEROXIDASE  
ENZYME ACTIVITIES

YÜKSEK LİSANS

Abdoulaye COULIBALY

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ

ŞUBAT-2026  
GÜMÜŞHANE



## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI**

**Yüksek Lisans Tezi** olarak hazırlamış olduğum “**Karadut (Morus nigra L.) Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri ve Serum Paraoksonaz1 Arilesteraz Katalaz ve Miyeloperoksidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi'nin lisanslı kullanıcısı olduğum intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

**10//02/2026**

.....  
**Abdoulaye COULIBALY**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımı almamla sonuçlanan bu çalışma yıllarım boyunca bana sağlık ve uzun ömür bahşeden Tanrı'ya şükrediyorum.

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve manevi destekleri ile her konuda yardımını esirgemeyen Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında eğitimim sırasında ders aldığım, bilgilerinden istifade ettiğim Hocalarıma müteşekkirim. Özellikle laboratuvar çalışmalarında yöntem malzeme temini ve cihaz kullanımları konusunda yardımcı olan Prof. Dr. Cemalettin BALTACI'ya, Araş. Gör. Dr. Ömer KARPUZ'a ve Dr. Osman AKMEŞE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu diploma, 2025 yılında vefat eden babam Coulibaly Harouna'ya adanmıştır; onun varlığı ve desteği, hayatımın her aşamasında benim için her zaman bir güç ve kararlılık kaynağı olmuştur.

Son olarak, üniversite hayatım boyunca bana yorulmak bilmeyen bir destek olan aileme ve tüm yakınlarıma teşekkür ederim.

**Abdoulaye COULIBALY**  
**GÜMÜŞHANE - 2026**

## ÖZET

Paraoksonaz (PON) aynı zamanda arilesteraz (ARE) aktivitesine de sahip olan, lipoprotein metabolizmasında aterosklerotik role sahip klinik bir enzimdir. Katalaz (CAT) hidrojen peroksitin bertaraf edilmesinde rol oynarken, Miyeloperoksidaz (MPO) ise bakteriyel enfeksiyonlarda nötrofillerce salınan bakterisidal etkiye sahip bir enzimdir. Bu koruyucu etkisine rağmen prooksidan etkisi kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda önemli bir tıbbi bitki olan karadut (*Morus nigra L*) meyvesinin yüksek polifenolik içeriği ve antioksidan özelliğine bağlı olarak bu enzimlerin in vitro şartlarda serum aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Etik izinle biyokimya laboratuvarından hasta serumu serum havuzu oluşturuldu. Karadut meyvesinin sulu ve etanolik ekstraktlarında toplam fenolik madde (TPC), toplam flavonoid madde (TFC) içerikleri ile FRAP, DPPH, ABTS, total oksidan durum (TOS) ve total antioksidan durum (TAS) aktiviteleri belirlendi. Ayrıca karadut ekstraktlarının HPLC ile fenolik bileşik içeriği analiz edildi. Ekstraktların serumla beraber 25,50,75,100 ve 200 µg/mL'lik konsantrasyonları oluşturuldu ve bunların PON, ARE, CAT ve MPO enzim aktiviteleri üzerine etkileri spektrofotometrik ve kinetik belirlendi. Ekstraktlar genel olarak PON, ARE, MPO ve TOS aktivitelerini kontrol serumuna göre anlamlı ölçüde azaltırken, TAS, ve CAT değerlerinde ise artış görüldü ( $p<0.05$ ). Artış ve azalış miktarlarının özellikle 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda anlamlı olduğu görüldü HPLC analizinde toplam sulu çözeltilerde 5 adet, etanolik çözeltilerde 7 fenolik bileşik tespit edildi. Bunlar içinde Protokatekuik asit en yüksek konsantrasyona sahipti.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Arilesteraz, Karadut, Katalaz, Miyeloperoksidaz, Paraoksonaz

## SUMMARY

Paraoxonase (PON) is a clinical enzyme that also possesses arylesterase (ARE) activity and plays an atheroprotective role in lipoprotein metabolism. While catalase (CAT) plays a role in the elimination of hydrogen peroxide, myeloperoxidase (MPO) is an enzyme with bactericidal effects released by neutrophils during bacterial infections. Its pro-oxidant effect has been associated with cardiovascular diseases. In our study, we aimed to investigate the effects of the high polyphenolic content and antioxidant properties of the black mulberry (*Morus nigra L*) fruit—an important medicinal plant—on the serum activities of these enzymes under in vitro conditions. With ethical approval, a serum pool was established using patient serum from the biochemistry laboratory. Total phenolic content and total flavonoid content of all extracts of black mulberry fruit, as well as their FRAP, DPPH, ABTS, total oxidant status (TOS), and total antioxidant status (TAS) activities, were determined. Additionally, the phenolic compound content of extracts was analyzed by HPLC. Extracts were prepared at concentrations of 25, 50, 75, 100, and 200 µg/mL in serum, and their effects on PON, ARE, CAT, and MPO enzyme activities were determined spectrophotometrically and kinetically. In general, the extracts significantly reduced PON, ARE, MPO, and TOS activities compared to the control serum, while increases were observed in TAS and CAT values ( $p < 0.05$ ). It was observed that the extent of these increases and decreases was particularly significant at concentrations of 100 and 200 µg/mL. A total of 7 phenolic compounds were identified in the HPLC analysis. Among these, protocatechuic acid had the highest concentration.

**Keywords:** Antioxidant, Arylesterase, Blackberry, Catalase, Myeloperoxidase, Paraoxonase

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR .....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY .....	VII
İÇİNDEKİLER .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Oksidatif Stres.....	3
1.2.1.Serbest Radikaller .....	4
1.2.2. Antioksidan Sistemler:.....	6
1.3. Klinik Öneme Sahip Bazı Antioksidan Enzimler .....	6
1.3.1.Paraoksonaz.....	6
1.3.1.1. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi ve Klinik Önemi .....	7
1.3.1.2. PON Arilesteraz (ARE) Aktivitesi:.....	10
1.3.2. Miyeloperoksidaz (MPO).....	10
1.3.3. Katalaz.....	11
1.4. Tıbbi Bitkiler.....	12
1.4.1. Karadut .....	12
2. MATERYAL VE METOT .....	14
2.1. Kullanılan Cihazlar .....	14
2.2. Kullanılan Kimyasallar .....	15
2.3. Karadut Meyvesinin Toplanması ve Çalışma Grupları.....	16
2.3.1.Örneklerin Ekstraksiyonu.....	16
2.3.2.Serum ve Ekstrakt Örneklerinin Hazırlanması .....	17
2.4. Ekstraktlarda Antioksidan Kapasite Tayini ve Fenolik İçerik Analizi .....	17
2.4.1.Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC) Tayini .....	17
2.4.2.Toplam Flavonoid Madde İçerik (TFC) Tayini .....	18
2.4.3.Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi .....	19

2.4.4. ABTS Radikali Temizleme Kapasitesi .....	20
2.4.5. DPPH ( 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ) Radikali Yakalama Yöntemi.....	21
2.4.6. Demir III (Fe+3) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP) .....	22
2.4.7. Serum ve Ekstraktlarda Total Antioksidan Kapasite (TAS) .....	23
2.4.8. Serum ve Ekstraktlarda Total Oksidan Kapasite (TOS) .....	24
2.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	24
2.5.1. Paraoksonaz 1 (PON1) aktivitesi .....	24
2.5.2. Arilesteraz Enzim Aktivite Tayini .....	25
2.5.3. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini .....	26
2.5.4. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini .....	26
2.6. HPLC Fenolik Bileşik Analizi .....	27
2.7. İstatistik .....	28
3. BULGULAR .....	29
3.1. Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları .....	29
3.2. Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları .....	29
3.3. Enzim Aktiviteleri .....	30
3.6. HPLC Analizi Sonuçları .....	35
4.TARTIŞMA .....	37
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	41
KAYNAKÇA .....	42
ETİK KURUL KARARI .....	50
ÖZGEÇMİŞ .....	51

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Başlıca reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....	5
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.....	14
Tablo 3. Kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları .....	15
Tablo 4. HPLC analitik metot validasyon parametreleri .....	28
Tablo 5. Karadut etanolik ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik içerik (TPC) ve toplam flavonoid madde Miktarı (TFC) sonuçları.....	29
Tablo 6. Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları.....	29
Tablo 7. Sulu ve etanolik karadut ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda enzim ve oksidan/antioksidan etkileri .....	31
Tablo 8. HPLC Analizinde Sulu Karadut Ekstraktında Tespit Edilen Polifenolik Bileşikler .....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Serbest Radikaller ve Karakteristik Özelliklerine Genel Bakış .....	5
Şekil 2. Paraoksonazın paraokson kataliz reaksiyonu.....	7
Şekil 3. Paraoksonaz Enzim Substratları.....	7
Şekil 4. HDL metabolizme .....	8
Şekil 5. LDL oksidasyonu ve etkileri.....	9
Şekil 6. Laboratuvar çalışmalarında kullanılan çeşitli sarf ve ekipmanlar .....	16
Şekil 7. Toplam fenolik içerik için hazırlanan gallik asit standart grafiği.....	18
Şekil 8. Toplam flavonoid madde miktarı için hazırlanan kuersetin standart grafiği.....	19
Şekil 9. Toplam antioksidan kapasite için hazırlanan Trolox standart grafiği.....	19
Şekil 10. Toplam antioksidan kapasite için hazırlanan Askorbik Asit standart grafiği.....	20
Şekil 11. ABTS Trolox standart konsantrasyon grafiği .....	21
Şekil 12. ABTS Askorbik Asit standart konsantrasyon grafiği .....	21
Şekil 13. DPPH Trolox standart konsantrasyon grafiği .....	22
Şekil 14. DPPH Askorbik asit standart konsantrasyon grafiği .....	22
Şekil 15. FRAP FeSO <sub>4</sub> standart konsantrasyon grafiği .....	23
Şekil 16. HPLC Polifenolik bileşik standart kromatogramı .....	27
Şekil 17. Sulu ve etanolik bitki ekstraktlarının DPPH, ABTS, FRAP ve toplam antioksidan (TA) yöntemleri ile belirlenen antioksidan aktivite değerleri .....	30
Şekil 18. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının PON aktivitesi üzerine etkisi .....	32
Şekil 19. Ekstraktlara göre PON aktivitesi .....	32
Şekil 20. Ekstraktlara göre ARE aktivitesi .....	33
Şekil 21. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının TOS etkisi .....	33
Şekil 22. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının TOS etkisi .....	34
Şekil 23. Ekstraktlara göre Katalaz (KAT) Aktivitesi .....	34
Şekil 24. Ekstraktlara göre Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
$\mu$	: Mikro
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
$\text{AlCl}_3$	:Alüminyum klorür
ARE	:Ariesteraz
$\text{CH}_3\text{COOK}$	: Potasyum asetat
CAT	: Katalaz
DPPH $\cdot$	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
$\text{FeCl}_3$	: Demir (III) Klorür
FRAP	: Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik asit
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
HDL	: High Density Liporprotein
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HOCl	: Hipokloröz asit
KVH	: Kardiyovasküler hastalık
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	: Potasyum persülfat
L	: Litre
LDL	: Light Density Lipoprotein
oxLDL	: Okside LDL
LOO $\cdot$	: Lipid Perosil Radikali
mL	:Mililitre
mg	:Miligram
MPO	: Miyeloperoksidaz
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	: Sodyum karbonat
NO $\cdot$	: Nitrik Oksit Radikali
NO $_2\cdot$	: Azot Dioksit
O $_2\cdot^-$	: Süperoksit Anyonu

ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit
PON	: Paraoksonaz
QE	: Kuersetin eşdeğeri
R <sup>2</sup>	: Korelasyon katsayısı
RNS	: Reaktif Azot Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TPTZ	: 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-S-triazine
TAS	: Total Antioksidan durum
TFC	: Toplam flavonoid madde
TPC	: Toplam fenolik madde
TOS	: Total Oksidan durum

## 1. GENEL BİLGİLERİ

### 1.1.Giriş

Metabolizma sırasında oluşan oksidan ürünler vücutta ciddi zararlar oluşturabilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi oksidan moleküller protein, lipid ve DNA'da hasar oluşturabilme eğilimindedirler (Özcan vd., 2015). Vücudumuzda oksidan-antioksidan dengeyi korumaya yönelik çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmalarda kullanılan antioksidan kaynaklar hücre içi, hücre dışı ve dışarıdan destek şeklinde olabilmektedir. Hücre içi ve hücre dışı (genel olarak dolaşımda) pekçok enzim de antioksidan olarak görev yapmaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Vücudun işlev bozukluğuyla bağlantılı yeni patolojilerin ortaya çıkmasıyla birlikte, enzimatik aktivitenin incelenmesi, tanıyı kolaylaştırmak açısından yaygın biçimde kullanılan bir metottur. Hücre içi ve hücre dışında bulunabilen bu enzimlere Glutatyon peroksidaz (Peroksidazlar), Katalaz, Süperoksit dismutaz (SOD), Paraoksonaz (PON), Myeloperoksidaz (MPO) örnek olarak verilebilir (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Paraoksonaz 1 (PON1) özellikle lipid metabolizmasında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna ve dolayısı ile aterosklerotik kalp hastalığına karşı koruyucu rol oynadığı ifade edilen bir enzimdir. Paraoksonazın farklı substratlara etki edebilmesi bu enzimin aynı zamanda arilesteraz ve laktonaz enzim aktivitesi göstermesini sağlamaktadır. PON1'in genetik olarak polimorfik özellik göstermesi enzim aktivitesinde farklılıklara sebep olabilmektedir (Aviram, vd., 1998). Bu nedenle son zamanlarda polimorfizmden daha az etkilenen arilesteraz ve laktonaz aktivitesi de öne çıkmaktadır.

Myeloperoksidaz enzimi bazı durumlarda pro-oksidan aktivite gösterir ve bakteriyosidal etki olarak tanımlanan ve nötrofillerin bakterilere karşı cevabında etkili olan bir enzimdir. MPO hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) kullanarak hipokloröz asit (HOCl) gibi halojenlenmiş oksidanlar oluşturur. MPO'nun her ne kadar bakterilere karşı oksidan etkisi olduğu ifade edilse de bu özelliği ile aynı zamanda LDL üzerinde oksidasyona sebep olduğu ve buna bağlı olarak ateroskleroza tetikleyebileceği çeşitli araştırmalarda ifade edilmiştir (Nicholls ve Hazen, 2009). Katalaz başka bir önemli antioksidan enzim olup özellikle süperoksit dismutaz gibi diğer bazı antioksidan enzimlerin süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüştürmesi

ile biriken hidrojen peroksiti suya ve moleküler oksijene parçalar. Nitekim  $Fe^{+2}$  varlığında gerçekleşebilecek femtom reaksiyonu sonunda başka bir oksidan olan hidroksi radikalının oluşumu ve zararlı etkileri engellenmiş olur (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Bitkiler çevresel uyum için metabolik prosesler sırasında çok geniş sayıda sekonder metabolit olarak adlandırılan ve gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çeşitli hastalıkların tedavisinde çok uzun zamandan beri kullanılan ürünler oluşturur. Bu ürünler günümüzde de tarım, tıp ve farmakoloji gibi endüstriyel alanlarda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Acıbuca, vd., 2018; Kılınç vd, 2025 ; Darak vd, 2024). Bu bileşiklerin başında fenolik bileşikler vitaminler alkaloidler gibi çeşitli moleküller sayılabilir ve bunlar bitkinin tohum-çekirdek, meyve, gövde, yaprak, kök ve kabuk gibi çeşitli kısımlarından elde edilmektedir. Bu bileşiklerin başlıca özellikleri antiinflamatuvar, antioksidan özelliklerin oldukça baskın olmasıdır. Nitekim bu bileşikler inflamatuvar, oksidatif hastalıklar, kanser, nörodejeneratif, kemik, gasteointestinal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kılınç, vd., 2019).

Tıbbi bitkiler dahil olan karadut en yaygın 3 dut grubundan biridir: Karadut (*Morus nigra*), Beyaz dut (*Morus alba*), Kırmızı dut (*Morus rubra*). Güneybatı Asya'da yaygın olan dutgiller Orta Avrupaya kadar uzanmakta ve çok farklı yüksekliklerde dahi yetişebilmektedir. Endüstriyel olarak yaprakları ipek böceği yetiştiriciliğinde kullanılmakta, özellikle meyve ve meyve suyu ise gıda, kozmetik, farmakolojik alanlarda tercih edilmektedir .

Kolay bulunabilmesi, karadut meyvelerinin şeker ve aromatik içeriği sayesinde lezzetli olması tüketimini kolaylaştırmaktadır. Karadut diğer dutgillerde olduğu gibi geleneksel tedavi amacıyla örneğin ağız yaralarının (aft) iyileştirilmesinde çok uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Pekçok çalışmada karadutun antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antidiyabetik, hepatoprotektif, antiaterosklerotik, antihiperlipidemik ve antimikrobiyal aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Demir, vd., 2017; Lim ve Choi, 2019). Yapılan fitokimyasal analizlerde karadutun bu sağlık üzerine pozitif etkilerinin yapısında bulunan öncelikle fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ifade edilmektedir. Bu bileşikler içinde başlıca antosiyanidinler (siyanidin-3-glikozid, siyanidin-3-rutinosid vb), fenolik asitler ( gallik asit, ferulik asit, kafeik asit vb.), flavonoid ve tanenler sayılabilir (Ercişli ve Orhan, 2008; Huo vd., 2023).

Bu çalışmada yukarıda belirtildiği gibi başta antioksidan etkisi olmak üzere zengin fenolik bileşikleri sayesinde çeşitli fitoterapötik etkilere sahip olan karadutun

(*Morus nigra*) serumda bulunan bazı antioksidan enzim aktiviteleri (paraoksonaz, arilesteraz, katalaz) ile güçlü bir bakteriyosidal ekiye sahip olan ve prooksidan özellik gösteren miyeloperoksidaz enzim aktivitesi üzerine in vitro etkilerinin ve olası sebeplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücresel cevap (protein sentezi vb) yerine ekstrakt + serum karışımında fenolik bileşiklerin enzimlerle yapacağı bağların, aktif bölge veya substrat üzerinden etkileşimlerin, enzim inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanabileceği düşünülmüştür.

## 1.2 Oksidatif Stres

Canlı organizmalarda hücresel metabolizmanın doğal bir sonucu olarak sürekli biçimde reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) ve reaktif azot türleri (Reactive Nitrogen Species, RNS) üretilmektedir. Serbest radikaller olarak da bilinen bu reaktif moleküller, fizyolojik düzeylerde hücresel sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi temel biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir. Ancak bu reaktif türlerin üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması, hücre ve dokularda oksidatif stres olarak tanımlanan patolojik bir duruma yol açmaktadır (Gülçin, 2012) .

İlk defa Sies (1985) tarafından “biyolojik sistemlerde prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması” şeklinde tanımlanan oksidatif stres “lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücresel makromoleküllerin oksidatif hasara uğramasına neden olan reaktif türlerin aşırı birikimi” olarak genişletilmiş tanımı ile güncellenmiştir (Krisnamuthy vd., 2024). Bu süreç, hücresel bütünlüğün bozulmasına, enzim fonksiyonlarının kaybına ve genetik materyalin zarar görmesine neden olarak birçok kronik ve dejeneratif hastalığın patogeneğinde merkezi bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Karabulut ve Gülay 2016).

Oksidatif stresin ortaya çıkmasında çeşitli faktör etkili olmaktadır. Kabaca endojen ve eksojen kaynaklar olarak sınıflandırılabilen bu faktörlerden endojen kaynaklı faktörler olarak fizyolojik olarak mitokondriyal solunum sırasında gerçekleşen elektron kaçakları, inflamasyon sırasında inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve peroksizomal reaksiyonlar yer alırken; eksojen faktörler arasında çevresel toksinler, hava kirliliği, ultraviyole ve iyonize radyasyon, sigara dumanı, ağır metaller ve bazı farmakolojik ajanlar bulunmaktadır (Valko vd., 2007; Karabulut ve Gülay 2016). Ayrıca yaşlanma, metabolik sendrom, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durumun oksidatif stres ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir .

Oksidatif stresin temel belirleyicileri olan oksidanlar, biyolojik sistemlerde yüksek aktiviteye sahip moleküller olup hücre içi yapılarla hızla etkileşime girerler. Başlıca süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi farklı kimyasal formlarda bulunmaktadır ve özellikle kontrolsüz üretimleri veya bertaraf mekanizmalarında bozukluk durumunda hücrel homeostatik dengeyi bozma yeteneğine sahiptirler. Dolayısı ile oksidanların oluşum mekanizmalarının ve biyolojik etkilerinin anlaşılması, oksidatif stres ilişkili hastalıkların tanı, tedavi ve önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Valko vd., 2007; Krisnamuthy vd., 2024).

### 1.2.1 Serbest Radikaller

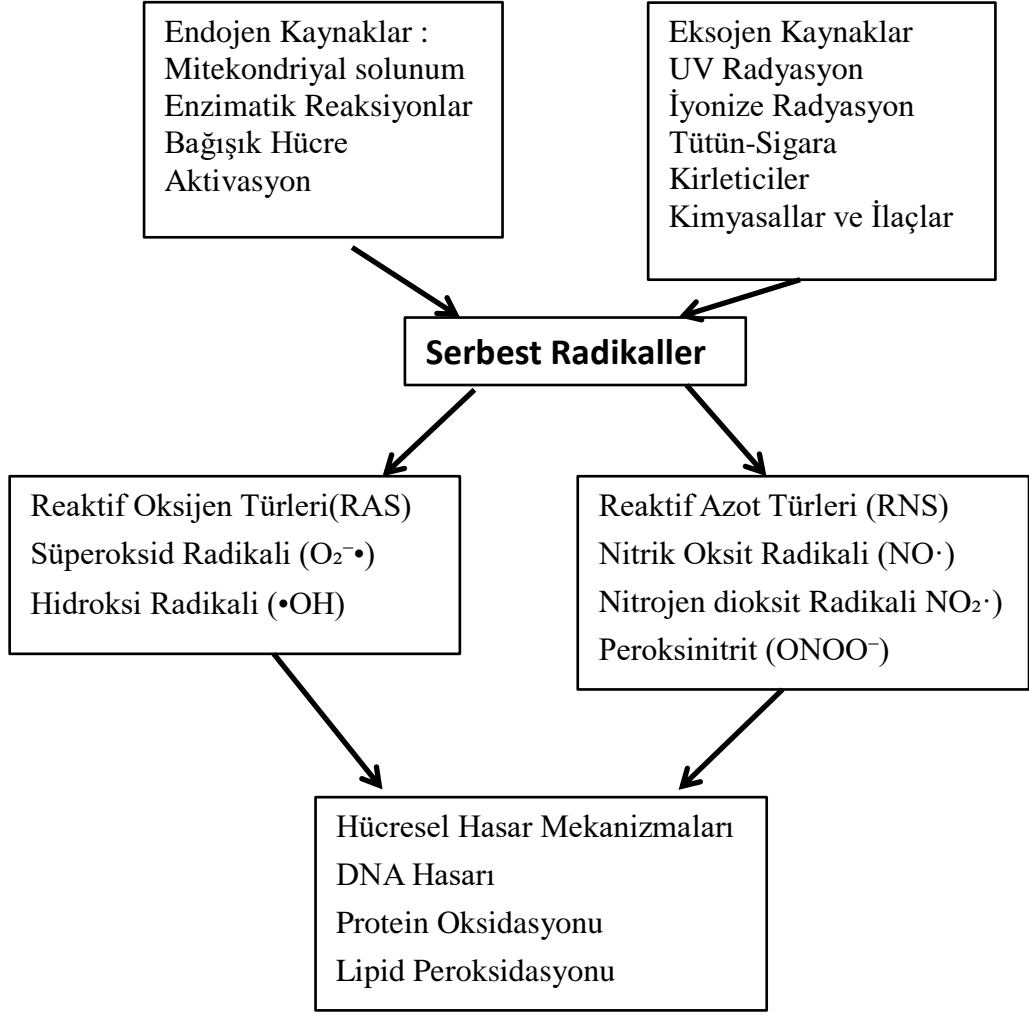
Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan moleküller veya molekül parçaları olarak tanımlanır (Özcan, vd., 2015). Bu eşleşmemiş elektronlar kararsızdır ve genellikle serbest radikale önemli derecede reaktivite kazandırır.

Serbest radikaller düşük konsantrasyonlarda insan vücudunda birçok normal fizyolojik fonksiyona müdahale ederek (sitokrom P450 ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, fagositoz ile enfeksiyon etkenlerine karşı savunma, makrofajlar ve sitotoksik lenfositler tarafından kanser hücrelerinin yok edilmesi) yararlı özellikler göstermektedir. Bununla beraber oksidatif stres durumunda yani oksidatif dengenin bozulması, antioksidan miktarında veya aktivitesinde azalma ya da oksidan- serbest radikal seviyesinde artış durumunda serbest radikaller başta hücrel bazda ardından doku ve organ seviyesinde zararlı etkiler gösterirler. Örneğin kardiyovasküler hastalıklar- başlıca ateroskleroz- diyabet, alzheimer gibi nörolojik bozukluklara yol açabilmektedirler (Krisnamuthy vd., 2024).

Oksidatif stres hücrel bazda etkisini 4 aşamalı olarak gösterir (Özcan, vd., 2015).

- Membran lipiplerinin perokside edilmesi
- Protein oksidasyonu
- DNA hasarı
- Hücrel bütünlüğün bozulması ve yıkımı.

Serbest radikaller normal fizyolojik şartlarda metabolizma sırasında oluşabildiği gibi bağışıklık sistemi, inflamasyon, çevresel kirlilik, radyasyon, sigara. Toksinler ve ağır metaller gibi eksojen ve endojen etmenler sonucunda meydana gelebilir (Şekil 1).



Şekil 1. Serbest Radikaller ve Karakteristik Özelliklerine Genel Bakış (Chandimali vd'den, 2025, modifiye edilmiştir).

Oksidatif streste rol oynayan başlıca ROS ve RNS türleri Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Başlıca reaktif oksijen ve nitrojen türleri (Di Meo, vd, 2016).

Radikaller	$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Anyonu
	$\cdot OH$	Hidroksi Radikali
	$NO\cdot$	Nitrik Oksit Radikali
	$NO_2\cdot$	Azot Dioksit
	$LOO\cdot$	Lipid Perosil Radikali
Radikal Olmayanlar	$H_2O_2$	Hidrojen Peroksit
	$HOCl$	Hipoklorik Asit
	$ONOO^-$	Peroksinitrit

### 1.2.2. Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar hücre dışı ve hücre içi ortamlarda, metabolizma sonucu meydana gelen serbest radikalleri süpürücü özellikleri sayesinde yakalayıp etkilerini engelleyen

veya minimuma indiren dolayısı ile hücre ve doku yapısını koruyan moleküllerdir (Halliwell, 1995). Enzimler antioksidan sistemler içinde önemli yere sahip moleküllerdir.

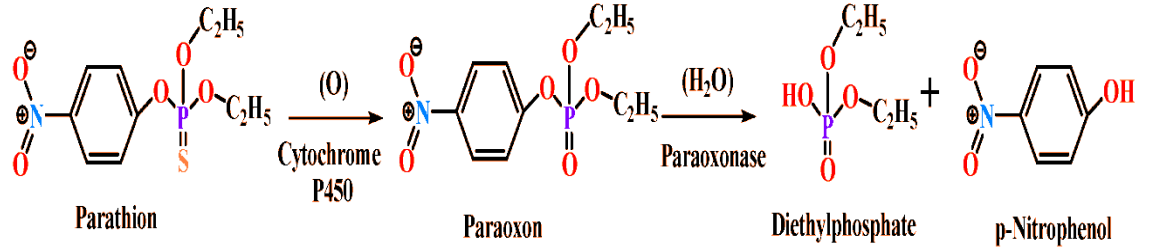
### **1.3. Klinik Öneme Sahip Bazı Antioksidan Enzimler**

#### **1.3.1. Paraoksonaz (PON1)**

İnsan serum paraoksonaz enzimi organofosfat bileşiklerini hidrolize edebilen bir enzimin varlığını bildiren Abraham Mazur'un 1946'daki çalışmasının ardından, 1950'lerin başında tanımlanmıştır

Paraoksonaz, karaciğerde sentezlenen ve bir insektisit parationun metaboliti olan paraoksonu hidroliz edebilen bir serum esteraz enzimidir (Şekil 2). Paraoksonaz enziminin ayrıca karboksilik asit esterleri, diazookson, soman ve sarin gibi çeşitli organofosfat kökenli bileşikleri aril ester ve laktonları da metabolize ve detoksifiye edebildiği gösterilmiştir (Şekil 3) (Ekmekçi vd., 2004; Memişoğulları ve Orhan 2000; Mohammed vd., 2022). Enzimin içinde katalitik aktiviteyi ve yapının stabilizasyonunu sağlayan iki kalsiyum atomu vardır. PON heliks olarak bağlandığı organofosfat substratlarının hidrolizi sayesinde nörotoksisiteye karşı esas olarak PON1 tarafından sağlanır.

Paraoksonaz ailesi üç enzimden oluşan bir gruptur. Bunlar paraoksonaz-1 (PON1, EC 3.1.1.2, 3.1.1.81, 3.1.8.1), paraoksonaz-2 (PON2) ve paraoksonaz-3 (PON3). PON1 355 amino asit kalıntısına sahip 43 kDa bir glikoproteindir (Taler-Verčič vd., 2020). İnsanlarda paraoksonaz gen ailesi yan yana olacak şekilde 7. Kromozomun uzun kolunda (7q21.3-22.1) bulunmaktadır (Chistiakov vd., 2017). Bu proteinin başlıca sentez yeri karaciğerdir. Burada sentezlenen paraoksonaz plazmaya kan dolaşımına verilir. Dolaşımda paraoksonazın hidrofobik N terminal kısmı yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'nin protein içeriği, özellikle Apolipoprotein A1, ile bağlantılı olmaya elverişlidir ve HDL yapısına katılır. Dolaşımda büyük oranda HDL yapısında bulunur (Goswami vd 2009; Meneses vd., 2019). HDL, yapısındaki bazı reseptör ligandı görevi gören proteinler vasıtası ile dolaşımda fazla kolesterolün birikmesini engellemesi ve yine yapısındaki paraoksonaz gibi bazı enzimler sayesinde düşük yoğunluk lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önlemesi sebebi ile iyi huylu kolesterol olarak ifade edilmektedir (Goswami vd 2009; Sviridov vd., 2008).

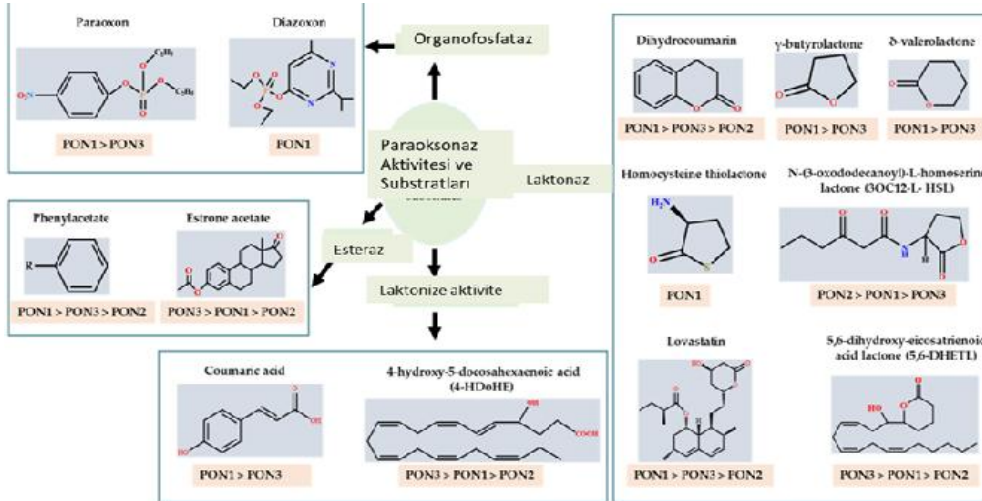


Şekil 2. Paraoksonazın paraokson kataliz reaksiyonu (Mohammed vd., 2022)

### 1.3.1.1. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi ve Klinik Önemi

In vitro analizler, PON1 ve PON3'ün düşük yoğunluklu lipoproteindeki (LDL) lipid oksidasyonunu inhibe ettiğini, böylece aterosklerozun başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan oksitlenmiş lipidlerin seviyelerini azalttığını göstermektedir.

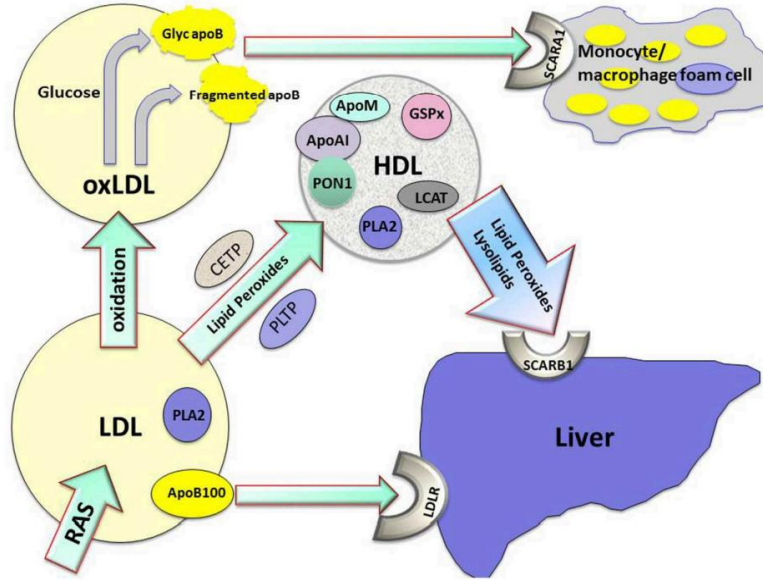
PON enzimleri, homosistein tiyolaktonun hidrolizi ve inaktivasyonu, makrofajların kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ve bunların dışarı akışının uyarılması, fosfolipidlerin hidrolizinde fosfolipaz A2'nin etkisi gibi çeşitli aktivitelerle bağlantılıdır.



Şekil 3. Paraoksonaz Enzim Substratları (Mohammed vd., 2022)

**PON ve Ateroskleroz :** Paraoksonaz geni polimorfik özelliğe sahiptir. Bu enzimin lipoprotein metabolizmasında özellikle yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) yapısında bulunduğu, özellikle düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonunu engellediği böylece aterosklerozda rol oynayan okside lipid miktarını azaltması ile bir tür koruma sağladığı ifade edilmektedir (Aviram vd., 1998). Bu yanı ile özellikle aterosklerozla karşı koruyucu rolü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Paraoksonaz ailesinin ayrıca organofosfatların sinir

sisteminde gerçekleştirdiği nörotoksitenin engellenmesinde, aterosklerotik vasküler hastalık için risk faktörlerinden biri olan homosistein tiyolaktonunun hidrolizi ve inaktivasyonunda da rol oynamaktadır (Gowsami vd, 2009).



Şekil 4. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) lipid hidroperoksitler ve lizolipidlerin metabolizmasındaki rolü ve aterogeneze karşı koruma. Apo AI, apolipoprotein AI; apoB100, apolipoprotein B100; apoM, apolipoprotein M; CETP, kolesterol ester transfer proteini; glyc apoB, glikozile apolipoprotein B; GSPx, glutasyon peroksidaz; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; LDLR, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü; oxLDL, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein; PLA2, fosfolipaz A2; PLTP, fosfolipid transfer proteini; PON1, paraoksonaz 1; RAS, reaktif oksijen türleri; SCARA1, çöpçü reseptörü A1; SCARB1, çöpçü reseptörü B1 (Soran vd., 2015).

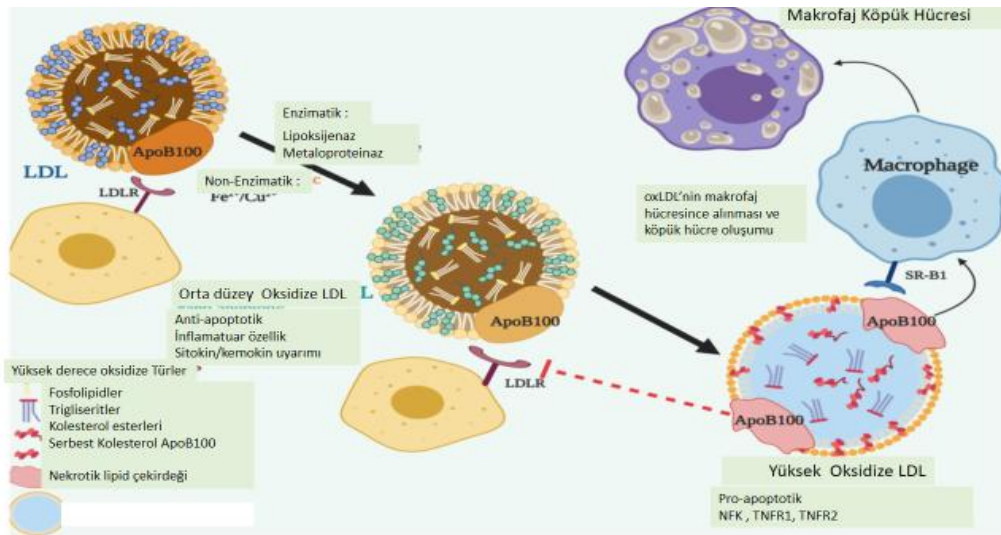
Ateroskleroz felçlere, kalp krizlerine ve arterlerle ilgili bozukluklara neden olan bir hastalıktır. Bu hastalıkta özellikle oxide olan düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) başlattığı ve buna cevap olarak inflamatuvar yanıtın geliştiği, monosit hücrelerinin yanıt olarak endotel hücre çağrısı ile bölgede toplanıp lümen dışına göç ettiği, damar etrafındaki kas tabakası içinde makrofaja dönüşerek oxLDL moleküllerini fagosite ettiği ve sonunda metabolize edemediği bu moleküller sebebi ile oldukça fazla kolestrol ve diğer yağ moleküllerini biriktirerek lümeni daralttığı ifade edilmektedir (Jaouad vd., 2006) (Şekil 5). Gelişimi, intimadaki yüksek düzeydeki lipitten kaynaklanır ve bu da arter duvarında sürekli hasara neden olduğundan dolayı hasarlı alanda kronik inflamasyonu gelişimini tetikleyebilir (Pahwa ve Jialal, 2023; Ross ve vd., 1999).

Yüksek düzeyde homosistein ve homosistein-tiyolakton, vasküler patolojilere neden olur. Düzeyindeki bu artış, kolesterol akışının uyarılmasından sorumlu PON1

aktivitesinin azalmasından, HDL ve LDL'de lipit peroksidlerin birikmesinin önlenmesinden kaynaklanır. Oksitlenmiş fosfolipidleri yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL) metabolize eder. (Grzegorzewska vd., 2020).

PON1, aterosklerozun gelişiminde primer rolü olduğu düşünülen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı HDL'nin yapısına katılarak çeşitli aktivitelere katkıda bulunan bir enzimdir. HDL, anti-inflamatuar, antitromboz, antioksidan aktivitesi ve ters yönde kolesterol taşınımı özellikleri sayesinde aterosklerozun önlenmesinde önemli bir rol oynar. PON1 ve HDL'nin antioksidan aktivitesi, anti-aterojenik özelliklerden birini oluşturur (Bounafaa vd., 2014; Sviridov vd., 2008).

PON1'in antioksidan aktiviteleri Cys284 pozisyonundaki aminoasidin serbest sülfhidril grubuna bağlıdır (Jaouad vd., 2006). Cys284, PON1'in antioksidan aktivitesinin bölgesini temsil eder (Aviram vd., 1998). Yaşlanma veya diğer stresli faktörler (diyabetik, obezite, sigara vb.) durumunda bu bölge oksidasyona uğrar, bu da PON1 aktivitesinde bir azalmaya yol açar. Dolayısıyla HDL'nin önlenmesindeki rolü önemli ölçüde azalır ve bu da bireyin aterosklerotik riske girmesine neden olur (Bounafaa vd., 2014; Cherki vd., 2007; Gbandjaba vd., 2012; Seres vd., 2004).



Şekil 5. LDL oksidasyonu ve etkileri (Dvyo ve Bassam'dan modifiye edilmiştir, Divya ve Bassam., 2021).

### 1.3.1.2. PON Arilesteraz (ARE) Aktivitesi

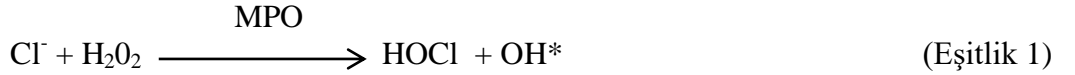
Arilesteraz aktivitesi PON enziminin bir diğer aktivitesidir. PON'un biyolojik fonksiyonunun bir parçası olmakla beraber bütün aktivitesini (paraoksonaz aktivitesi

olarak) ifade etmez, esas olarak Paraoksonaz-1 (PON1) enziminin ester hidroliz kapasitesini gösterir. Dolayısıyla antioksidan potansiyelini yansıtan fonksiyonel bir biyobelirteçtir. ARE aktivitesinin PON genotip farklılığından (Q192R polimorfizmi) etkilenmediği ve bu nedenle enzim düzeyini daha iyi yansıttığı düşük miktarlarda klinik olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Bhattacharyya vd., 2008).

### 1.3.2 Miyeloperoksidaz (MPO)

Miyeloperoksidaz (MPO: E.C. numarası: 1.11.2.2), peroksidaz ailesine aittir; esas olarak nötrofil granülositlerde ve çok az miktarda monositlerde bulunan bir enzimdir. Peroksidaz ve klorlama aktivitesine sahiptir (Klebanoff, 2005).

Mide mukozasına nötrofil infiltrasyonunun biyokimyasal belirteci olarak kullanılan MPO, bir hem peroksidazdır (EC 1.11.1.7), yaklaşık 11 kb boyutundadır ve 11 intron ve 12 ekzondan oluşur ve kromozom 17'nin uzun kolunda bulunan genin ürünüdür q23.1 (Van der Veen vd., 2009).



Biyolojik sıvılarda (lenf, asit sıvısı, eksüda sıvısı), plazmada ve dokularda anormal derecede yüksek MPO konsantrasyonları, nötrofillerin belirgin veya aşırı aktivasyonunun bir işaretidir. MPO, yoğun bakım patolojilerinde, kardiyovasküler hastalıklarda ve enfeksiyöz olmayan patolojilerde nötrofillerin aktivasyonu ve doku infiltrasyonu ile bağlantılı birçok patolojide bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Zhang vd., 2001; Hoy vd., 2002).

Klinik olaylara bakıldığında miyeloperoksidazın patolojik durumlarla ilişkili olduğu görülmektedir. Akut inflamatuvar patolojilerde (enfeksiyonlar, akut solunum sıkıntısı sendromu), MPO'nun plazma konsantrasyonları yüksektir. Aktive edilmiş enzim, alveollerde nötrofil sayısı ve bu hücrelerin degranülasyonunun diğer ürünleri (elastaz, laktoferrin) ve alveoler lavaj sıvılarının oksidatif aktivitesi ile korelasyon halinde bulunur (Mathy-Hartert vd., 2000). Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, felç, Parkinson hastalığı, depresyon, kafa travması ve epilepside görülen nöropatolojiyle ilişkilidir.

MPO, yüksek yoğunluklu lipoproteinleri (HDL) okside edebileceği ve bu durumda aterosklerotik plakların oluşumuna katkı sağlayabileceği belirtilmektedir

(Nicholls ve Hazen, 2009; Heller vd., 2000). Oksidatif stres altında PON1'in antioksidan özelliğini koruduğu, buna karşın MPO'nun akut inflamatuvar durumlarda konsantrasyonunun ve aktivasyonunun arttığı bilinmekte olup bu iki enzimin oksidatif durumda bir araya geldiği düşünülmektedir. Her iki enzimin birbirini nasıl etkileyeceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Böyle bir durumda bir tarftan PON1 MPO üzerinden oksidasyon etkisini azaltırken diğer tarftan MPO PON1'in 71. Pozisyonundaki tirozin aminoisidi üzerinden PON1 aktivitesini ve stabilitesini bozacağı ifade edilmektedir (Lewoń-Mrozek vd., 2024).

### 1.3.3. Katalaz (KAT)

Katalaz (E.C. 1.11.1.6) oksidoredüktaz grubu bir enzim olup mitekondride oksijenli solunum sırasında oluşan hidrojen peroksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) olası olumsuz etkilerinin elimine edilmesinde önemli rol oynar. En önemli antioksidan enzimlerden biri olan katalaz hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunmaktadır. İki aşamalı bir reaksiyonda iki hidrojen peroksit molekülünü bir oksijen molekülüne ve iki su molekülüne parçalar ve hücrel hidrojen peroksit düzeylerinin kontrol altında tutulmasını sağlar (Jyoti vd., 2018; Cinzia Signorini, 2019). Katalazın katalizlediği reaksiyon :



Klinik çalışmalarda katalaz aktivitesindeki değişimlerin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi durumlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle serum katalaz aktivitesi, oksidatif stresin değerlendirilmesinde klinik açıdan anlamlı bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Thyagaraju vd., 2008). Katalaz eksikliği veya işlev bozukluğu, diyabet, vitiligo, kardiyovasküler hastalıklar, Wilson hastalığı, hipertansiyon, anemi, bazı dermatolojik hastalıklar, Alzheimer hastalığı, bipolar bozukluk ve şizofreni gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir (Habib ve Lee, 2010).

## 1.4. Tıbbi Bitkiler

Organlarında, yapraklarında, yumrularında, kabuklarında ve meyvelerinde biyoaktif maddeler (alkaloidler, fenolik bileşikler ve diğerleri) içeren ve tıbbi amaçlarla kullanılan bitkiler, farmakolojik aktiviteleri nedeniyle tıbbi bitki olarak kabul edilir (Göktaş ve Gıdık, 2019). Son yıllarda özellikle tıbbi bitkiler, sahip oldukları

antioksidan aktiviteleri ve diğere bazı özellikleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bitkilerin bu özelliklerinin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kanser olmak üzere dejeneratif hastalık risklerinin azalmasıyla ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Pérez vd.,2008; Do vd., 2014). Bu noktada özellikle sekonder metabolit olarak ifade edilen ve bitkilerde çok sayıda çeşidi bulunan polifenolik bileşiklerin etkili olduğu düşünülmektedir (Kılınç vd., 2019).

Polifenolik bileşikler (flavonoidler, lignanlar, ligninler vb.) bitkilerin renk ve duyuşsal özelliklerine katkıda bulunur ve tohumlarda, meyvelerde, sebzelerde ve çiçeklerde bulunur (Pincemalla, 2007). ). Aromatik bir çekirdeğere (benzen halkası) doğrudan bağılı en az bir hidroksil grubunun (-OH) varlığıyla tanınırlar. Polifenoller, yapılarına bağılı olarak birkaç sınıfa ayrılır (Majewski vd., 2015) ve antioksidan, anti-inflamatuar, yaşlanma karşıtı ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle kullanılırlar (Sun vd., 2022).

### **1.5. Karadut (*Morus nigra*)**

Dutgiller ailesi (Moraceae), Kuzey ve Güney yarımkürelerde subtropikal, tropikal ve ılıman bölgeler dahil olmak üzere oldukça geniş bir iklimsel farklılığa, toprak ve yükselti çeşitliliğine ve ekonomik öneme sahip çiçekli bir bitkidir ve tıbbi bitkiler grubunda değerlendirilmektedir (Vijayan vd., 1997). Yaprakları ipekböcekleri için önemli ve önemli bir besin kaynağıdır. Meyveleri çeşitli ürünlerin hazırlanmasında kullanılır.Ülkemizde başlıca meyve üretimi, dut pekmezi ve reçel üretimi için tercih edilen dutgiller içinde özellikle beyaz dut (*Morus alba*), kırmızı dut (*Morus rubra*) ve karadut (*Morus nigra*) türleri en fazla bulunan türlerdir (Turan vd., 2017).

Karadut (*Morus nigra*), Moraceae familyasının *Morus* cinsine ait olup geleneksel tedavide çok eski zamanlardan beri kullanılan tıbbi bir bitkidir ve önemli ekonomik değere sahiptir. Kimyasal içerik bakımından tıbbi anlamda geniş bir kullanım alanına sahip olan polifenolik bileşik kaynağıdır. Yapılan çalışmalarda flavonoller, flavanonlar, antosiyaninler, fenolik asitler ve diğere düşük moleküler ağırlıklı fenolikler dahil olmak üzere 55 ayrı biyoaktif polifenol bileşik tanımlanmıştır (Khalifa vd., 2018). Özellikle antosiyaninler, *Morus nigra* meyvesine karakteristik siyaha yakın mor rengini veren ana bileşiklerdir ve toplam fenolik içeriğinin büyük bölümünü oluşturur (Mikulic-Petkovsek vd., 2012). Ana bileşenleri antioksidan, antiinflamatuar, antikanser, antimikrobiyal, antifungal, antidiyabetik, antihiperlipidemik, antiaterosklerotik, antiobezite, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, gibi birçok farmakolojik ve immünomodülatör aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Lim ve Choi, 2019; Turan vd., 2017).

Meyveleri, yaprakları ve hatta kabuğu çeşitli farmakolojik amaçlarla kullanılmakta olup bu biyolojik aktivitelerin büyük ölçüde polifenolik bileşiklerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Ercisli ve Orhan, 2007). Fenolik içerik ve antioksidan kapasite özellikleri meyvenin iklim özellikler ve toplandığı coğrafi bölgeye, ekstraksiyon metoduna, kullanılan çözücü cinsine göre değişiklikler gösterebilmektedir.

Nötrofil kaynaklı oksidan yükün önemli bir göstergesi olan MPO'nun aktivitesinde karadutun inflamasyon modellerinde azalma ve oksidatif dengenin iyileşmesiyle ilişkili etkiler rapor edilmiştir (de Pádua Lúcio vd., 2018).

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz ve Aletler	Marka/Model
Buzdolabı	Beko
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje)	ISO Lab
Çalkalayıcı İnkübatör	Shel Lab
Distile Su Cihazı	Merk Milipore
Eppendorf tüp (1,5 mL)	ISO Lab
Evaporatör	Heidolph
Etüv	Memmert
Falkon Tüp (15/50 mL)	Labsolute
Hassas Terazı (0,0001 Hassasiyet)	KERN
Havan	ISO Lab
HPLC	Agilent 1200 Infinity
Manyetik Isıtıcı/Karıştırıcı	IKA RH Basic 2
Mikroplakalar	Lp Italiana Spa
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific
Otomatik pipetler (10-20-200-1000µL)	Eppendorf/IsoLab
pH-metre	HANNA
Santrifüj (Soğutmalı)	Allegra X-30R
Spektrofotometre Cihazı	Shimadzu UV1800
Vorteks	Heidolph

## 2.2. Kullanılan Kimyasallar

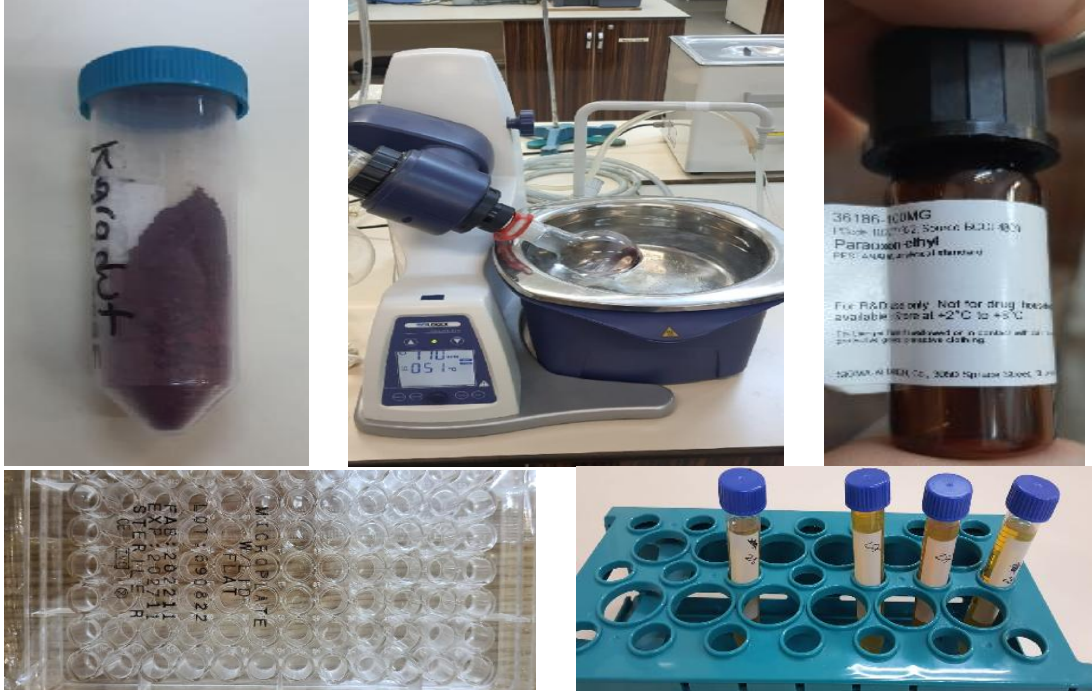
Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları

Kimyasal Maddeler	Firma/Kod
Alüminyum nitrat	Merck 101063ISO
Demir Sülfat (FeSO <sub>4</sub> )	Sigma
Etanol	Merck
Fenil Asetat	Sigma
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck 1.09001.0100
Fosfat tampon	Sigma Aldrich P4417
Gallik asit	Sigma Aldrich G7384
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma Aldrich
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Tekkim 7722841
Kuersetin	Merck 1592409
Metanol	Merck 106009
Ninhidrin	Merck 487472
o-dianisidin diklorür	Sigma
Paraoksonaz Kit	Rel Assay
Paraoxon	Sigma
Sodyum Asetat	Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck
di-Sodyum hidrojen fosfat	Sigma Alrich
di-Sodyum karbonat	Merck 106392
Sodyum hidroksit	Sigma
Sodyum klorür	Merck 100317
TAS Assay Kit	Rel Assay
TOS Assay Kit	Rel Assay
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck 76039
TPTZ	Sigma

### 2.3. Karadut Meyvesinin Toplanması ve Çalışma Grupları

Elazığ ilinden toplanmış karadut meyveleri yaklaşık 50 gramlık ağzı kapalı poşetler içinde buz aküsü bulunan mini dolaba alınarak laboratuvara ulaştırıldı ve çalışma yapılncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.



Şekil 6. Laboratuvar çalışmalarında kullanılan çeşitli sarf ve ekipmanlar

#### 2.3.1 Ekstraksiyon

Etanol / Sulu Ekstraksiyonu: Etanolik ve sulu ekstraktlar aynı şekilde hazırlanmış olup örneklerin etanol veya distile su ile ekstrakte edildi. Dondurulmuş karadut meyveleri kısa bir süre  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de tutulduktan vakumlu dondurma kurutma cihazında kurutuldu. Kurutma işleminden sonra bir blander yardımı ile meyveler toz haline getirildi. Toz haline getirilen örneklerden 3 gram tartıldı ve kapaklı 100 mL borasilikatlı cam şişede etanol /su ile 60 mL'e tamamlandı. Örnek vortekslendikten sonra 10 -12 dk 50 genlikte ultrasonik işleme tabi tutuldu.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 150 rpm'de 24 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler 2 kat kaba filtre kağıdından süzülde ve boş ağırlığı bilinen balon jojeye alındı. Balon jöje boş iken tartıldı. Evaporatör yardımı ile balon jöje içerisindeki çözücü uçuruldu. Uçurma sonrası kalıntıların ağırlığı tartıldı. Kalıntılar distile su ile çözdürüldü. Elde edilen ekstraktın bir kısmı antioksidan aktivite analizi için  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, bir kısmı ise enzim aktivite deneyleri için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de çalışma yapılncaya kadar ağzı kapalı şekilde muhafaza edildi.

### 2.3.2. Serum ve Ekstrakt Örneklerinin Hazırlanması

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Trabzon Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 29.04.2025 tarih ve 191 sayılı onayı ve Gümüşhane İl Sağlık Müdürlüğü'nün oluru ile Gümüşhane Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarından rutin analizleri tamamlanmış normal sonuçlu serum örneklerinden 15 mL'lik falkon tüplerine alınarak kapaklı bir serum havuzu oluşturuldu. Örnekler 250 mL'lik kapaklı bir deney şişesi içine birleştirilerek homojenize edildi ve ardından küçük hacimlerde alıgotlanarak – 80 ve – 20 derecelerde deney zamanına kadar saklandı. Bu örneklerden analizler sırasında test prosedürlerinde belirtilen final hacimlerine göre sulu ve etanolik karadut ekstraktları kullanılarak ayrı ayrı 25, 50, 75, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında 5 farklı serum + ekstrakt farklı karışımları hazırlandı. Her çalışma için aynı konsantrasyonlar kullanıldı. Çalışmalar 3 tekrar örnekleme ile yapıldı.

## 2.4. Ekstraktlarda Antioksidan Kapasite Tayini ve Fenolik İçerik Analizi

### 2.4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC) Tayini

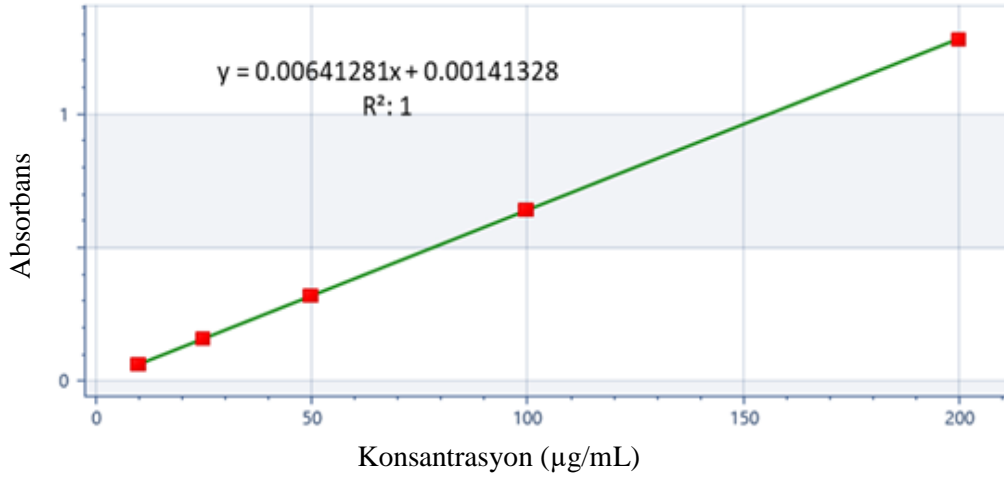
Bu yöntem Slinkard ve Singleton'un (1977) Folin-Ciocalteu metodundan yararlanılarak 96 kuyucuklu mikropalakaya adapte edildi (Darak vd., 2024). Bu metot fosfotungistik asitin bazik ortamda indirgenmesi ve mavimsi bir renk almasına dayanır. Yöntem:

Standart için gallik asitten 1000 µg/ml'lik stok hazırlandı ve stoktan 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda çözeltiler oluşturuldu. Konsantrasyon-absorbans grafiği çıkarıldı (Şekil 7). Toplam 50 mL hacimde %7,5 w/v olacak şekilde 3,75 gram sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) tartılarak distile su ile final hacme tamamlandı. Stok olarak elimizde 2N konsantrasyonda bulunan Folin-Ciocalteu reaktifinden 1/9 v/v sulandırma (distile su ile) yapılarak 50 mL 0.2 N reaktif hazırlandı. Kör olarak distile su kullanıldı.

#### *Deneyin Yapılışı*

96 plakalı kuyucukta ekstraktlar, standart ve kör kuyucuklarının yerleri belirlendi ve her biri için kuyucuğa 25 µL hacimde pipetlendi. Üzerlerine 100 µL, %10 (v/v) Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 100 µL %10 (w/v) sodyum karbonat çözeltisi (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ilave edildi. Bu işlemin ardından mikropalaka yine karanlık ortamda oda sıcaklığında yaklaşık 2 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre içerisinde renk değişimi reaksiyonu gelişti. Mikropalaka süre sonunda 760 nm'de Mikropalaka

okuyucuda köre karşı spektrofotometrik olarak okundu. Bütün standartlar, kör ve numuneler 3 tekrar olarak çalışıldı.



Şekil 7. Toplam fenolik madde için hazırlanan gallik asit standart grafiği

#### 2.4.2. Toplam Flavonoid Madde (TFC) Tayini

Karadut sulu ve etanolik ekstratlarının toplam flavonoid madde içeriğini belirlemek için Beara ve arkadaşlarının yöntemi (Beara vd., 2014), 96 kuyucuklu plakaya uyarlandı. Yöntem alüminyum klorürün ( $AlCl_3$ ) kolorimetrik analizine dayanmaktadır. Çalışmada standart olarak kuarsetin kullanıldı. 1 mg/mL kuersetin stoğu hazırlandı ve bu stoktan 25, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml'lik çözeltiler oluşturuldu ve standart grafiği çizildi (Şekil 8).

-%10'luk Alüminyum klorür çözeltisi: 1 gram alüminyum klorür tartılarak distile su 10 mL'ye tamamlandı. Bir balon jöjeye alınarak karanlıkta işlem yapana kadar saklandı.

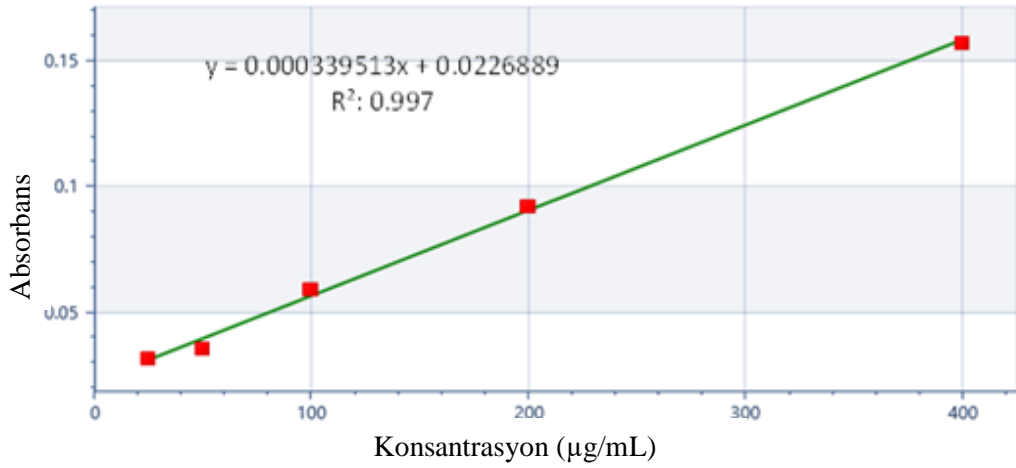
- 0,5 mol/L Sodyum nitrit ( $NaNO_2$ ) çözeltisi: 0,862 g  $NaNO_2$  bir miktar saf suda çözüldü ardından distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

- 1mol/L Sodyum hidroksit ( $NaOH$ ) çözeltisi: 2g  $NaOH$  saf suda çözüldü ve distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Deney :

Ekstraktlar, standart, kör ve kontrol örneklerinin herbiri mikropalakada kendi kuyucuklarına 50 µL olarak pipetlendi. Üzerlerine 170 µL metanol ilave edildi. Ardından 15 µL  $NaNO_2$  çözeltisi eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 15 µL  $AlCl_3$  çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletildi. Son olarak, 100 µL  $NaOH$  çözeltisinden pipetlendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından mikropalaka 506 nm

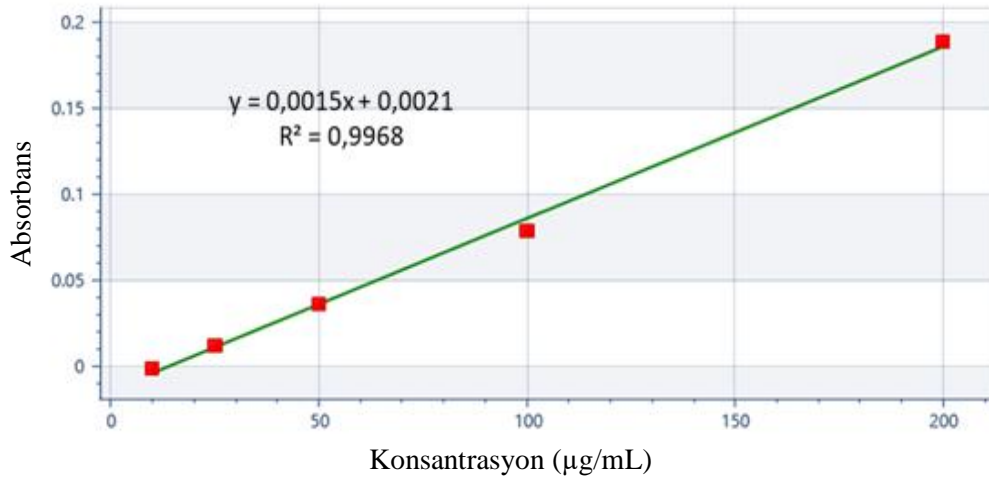
dalgaboyunda bir mikroluka okuyucuda absorbansları okundu. Standart grafiği kullanılarak fenolik madde konsantrasyonu belirlendi.



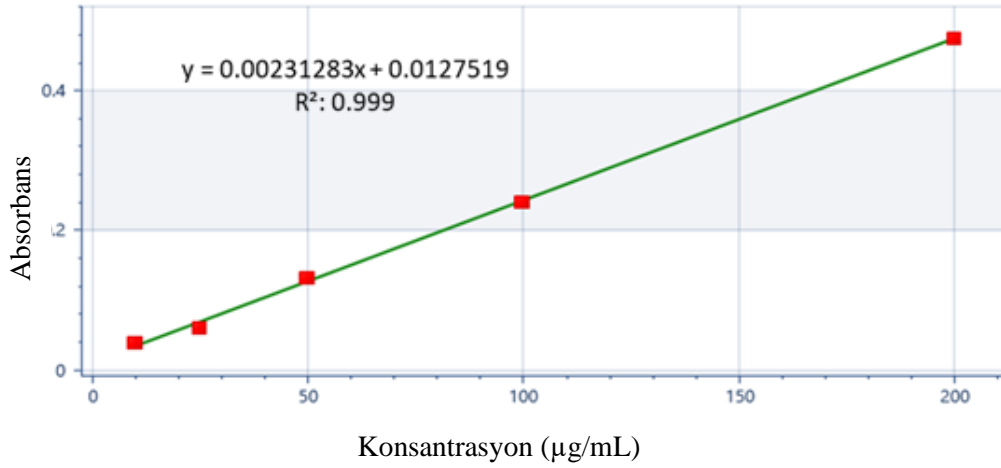
Şekil 8. Toplam flavonoid madde miktarı için hazırlanan kuersetin standart grafiği

#### 2.4.3. Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Toplam antioksidan kapasitesi (TAC), fosfomolibdenin indirgeme yöntemi kullanılarak Baltacı ve ark. (2024)'ten modifiye edilmiştir. Reaksiyon için 500 µL ekstrakt ile AA ve troloks standartları (5 - 200 µg/mL konsantrasyonlarda), 2500 µL deiyonize su ile karıştırılmış ve ardından 1000 µL taze hazırlanmış molibdat reaktifi eklenmiştir. Vortekslenen karışımlar kapalı tüplerde 95°C'de 1,5 saat inkübe edildi ve 20-30 dakika oda sıcaklığında soğutuldu. Ekstraktların yerine 500 µL deiyonize su kullanılarak bir reaktif kör örneği hazırlandı. UV-Vis spektrofotometrede 695 nm'de okuma yapılarak absorbans değerleri elde edildi.



Şekil 9. Toplam antioksidan kapasite için hazırlanan Trolox standart grafiği



Şekil 10. Toplam antioksidan kapasite için hazırlanan Askorbik Asit standart grafiği

#### 2.4.4. ABTS Radikali Temizleme Kapasitesi

ABTS radikali temizleme kapasitesi deneyi Silva ve arkadaşlarının Silva vd., (2007) mikropalakaya uyarlığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı.

##### Çözeltiler:

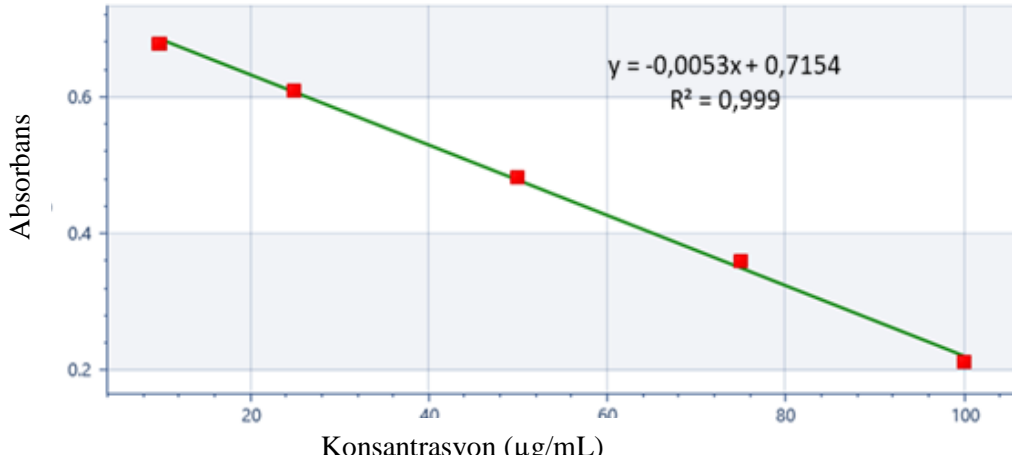
7 mmol/l ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu) radikal çözeltisi: Hassas terazide 38,4 mg ABTS tartıldı ve 10 ml saf suda çözüldü.

Potasyum persülfat ( $K_2S_2O_8$ ): 6.6 mg Potasyum persülfat tartıldı üzerine 10 mL saf su eklenerek çözüldü. Çözeltiler eşit hacimde aynı tüpe aktarıldı. ABTS radikal çözeltisi 734 nm'de  $0,706 \pm 0,001$  absorbans değerine kadar seyreltildi ve oda sıcaklığında 12 saat karanlıkta ABTS radikalinin oluşması için inkübe edildi.

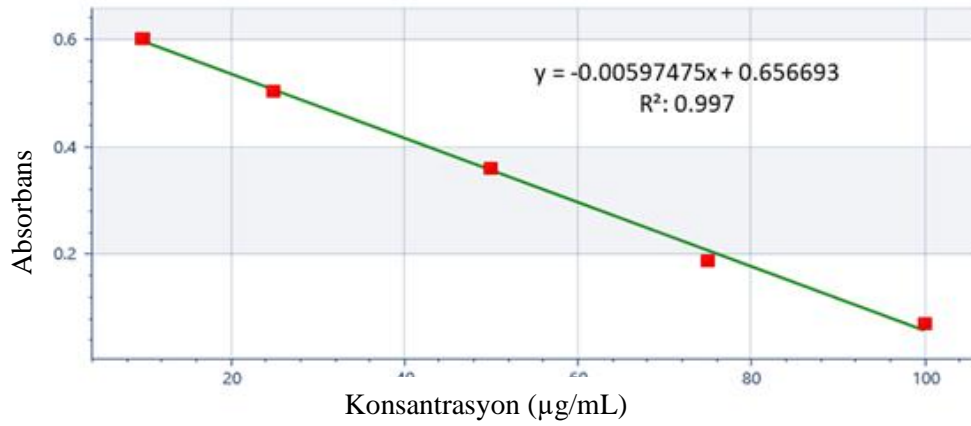
Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı ve 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'lik konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı (Şekil 9 ve Şekil 10).

##### Deney :

Ekstraktlar, standart ve körden 25'şer  $\mu\text{L}$  mikropalakada kuyucuklarına pipetlendi. Kör olarak 25  $\mu\text{L}$  distile su kullanıldı. Bu işlemi takiben tüm kuyucuklara 275  $\mu\text{L}$  ABTS radikal çözeltisi eklendi. Antioksidanlar ABTS radikalini indirgemesi için 5-6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda mikropalaka 734 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda spektrofotometrik olarak okundu. Standart grafikleri kullanılarak ABTS radikal giderme aktivitesi standart grafikleri şekil 18 ve şekil 19 kullanılarak (Şekil 11 ve Şekil 12) hesaplandı (Kahraman, S. 2009).



Şekil 11. ABTS Troloks standart konsantrasyon grafiği



Şekil 12. ABTS Askorbik Asit standart konsantrasyon grafiği

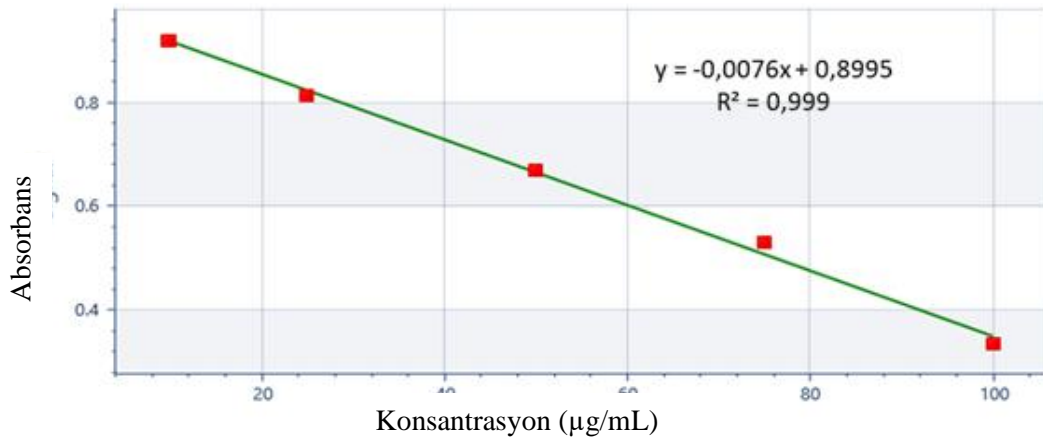
#### 2.4.5. DPPH ( 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ) Radikali Yakalama Yöntemi

DPPH Radikali Yakalama Yöntemi Soler-Rivas vd.nin (2000) DPPH yönteminin 96 kuyucuklu mikropalakaya uyarlanması ile gerçekleştirildi. Standart olarak troloks ve AA kullanıldı. 10 mg troloks ve askorbik asit hassas terazide tartılarak ayrı deney tüplerine alındılar. 1mL metanol içerisinde AA ve trolox çözüldükten sonra hacmi 10 mL'ye metanol ile tamamlandı. Hazırlanan 1000 µg/mL'lik stok çözeltilerden etanol ile gerekli seyreltmeler yapılarak 5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/mL'lik konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı (Şekil 13 ve Şekil 14).

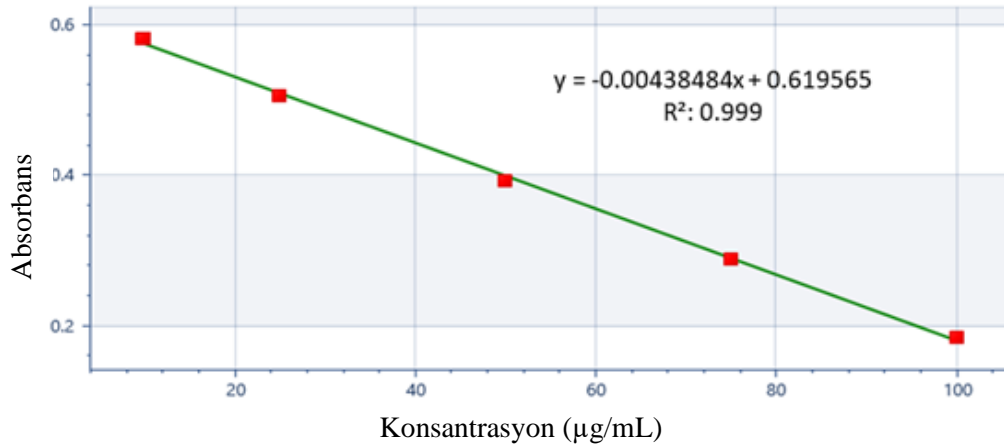
90 µmol/L DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal çözeltisi; 8,9 mg DPPH tartıldı. Bir miktar metanol ile çözüldü ve 25'lik balon jode son hacmi metanol ile 25 mL'ye tamamlandı. Çözeltileri ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kapatıldı ve karanlıkta saklandı.

*Deneyin Yapılışı:*

Sulu ve etanolik karadut ekstraktları, standart ve körlerin her birinin yerleri belirlenerek mikropalakada kendilerine ait kuyucuklara 25 µL hacimde pipetlendi. Sırası ile 100 µL DPPH çalışma çözeltisi ardından 75 µL metanol tüm kuyucuklara eklendi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyonun ardından 517 nm’de mikropalaka okuyucuda spektrofotometrik olarak absorbanslar okundu. Sonuçlar troloks eşdeğeri (TEAC) ve askorbik asit eşdeğeri (AAE) olarak verildi. Örneklerde DPPH radikal temizleme miktarlar; standart grafiklerinden (Şekil 14 ve şekil 15 ) elde edilen denklemlere göre hesaplandı (Ahmed vd. 2015).



Şekil 13. DPPH Trolox standart konsantrasyon grafiği



Şekil 14. DPPH Askorbik asit standart konsantrasyon grafiği

#### 2.4.6. Demir III (Fe<sup>+3</sup>) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP)

Ahmed vd.’nin, Demir III (Fe<sup>+3</sup>) İndirgeyici Güç Tayini (FRAP) metodunun (Benzie ve Strain, 1996) 96 kuyucuklu mikropalakaya uyarlanmasıyla yapılmıştır (Ahmed vd., 2015). Deneyde standart olarak demir II sülfat (FeSO<sub>4</sub>) kullanılmıştır. Hazırlanan 1 mg/ml’lik stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 5, 10, 25, 50,

100, 150, 200 konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı ve standart grafiği elde edildi (Şekil 15). Deney için 3 temel çözelti önceden hazırlanarak deney sırasında bu çözeltiler birbirine karıştırılır.

Çözeltiler:

I. 300 mM Sodyum Asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) tamponu (pH: 3.6): 2,46 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  tartılıp bir miktar distile su ile çözüldü. Çözeltiye %99 saflıkta glasiyel asetik asitten ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 1,6 mL ilave edilerek pH 3,60' a ayarlandıktan sonra balon jöjede distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

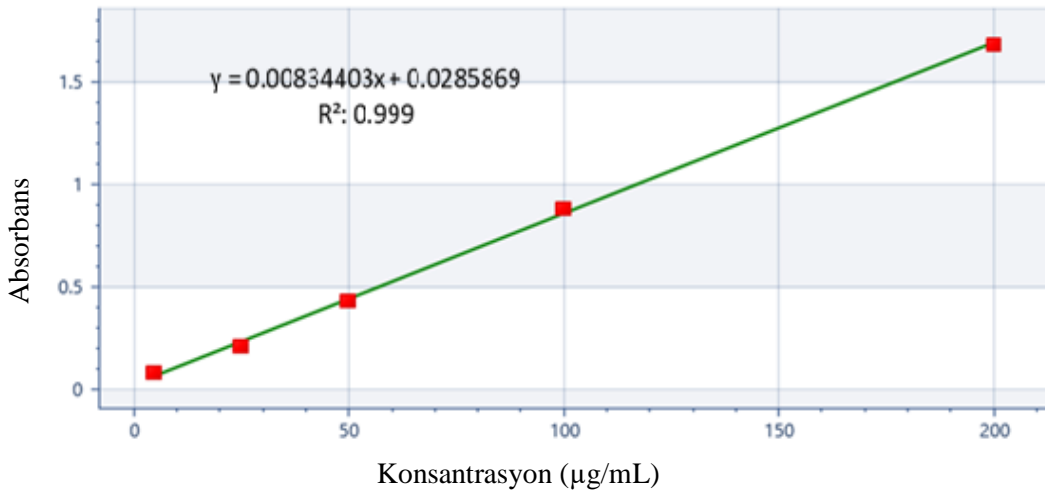
II. 10 mmol/L TPTZ [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine] Çözeltisi: 31.2 mg TPTZ tartıldı. Üzerine 4 mL HCl (40 mM) çözeltisi eklendi. Çözelti distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

III. 20 mM Demir III Klorür ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): Hassas terazide 1,35 gram  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tartıldı ve 250 mL'lik balon jöjeye alındı.

FRAP reaktifi : Yukarıda hazırlanan çözeltiler (Na-asetat tamponu, TPTZ ve  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ) sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılarak FRAP reaktif hazırlandı.

*Deneyin Yapılışı*

Karadut sulu ve etanolik ekstraktlar deneme ile belli konsantrasyonlarda seyreltildi. Ekstraktlar, kör ve standartların her birinden 25 $\mu\text{L}$  alınarak mikropalakaya eklendi. Üzerlerine 275  $\mu\text{L}$  taze hazırlanmış olan FRAP reaktifinden pipetlenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Ardından 593 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda köre karşı okuma yapıldı. Kör olarak saf su kullanıldı. Her bir numune ve standartlar 3 tekrar olarak çalışıldı.



Şekil 15. FRAP FeSO4 standart konsantrasyon grafiği

### 2.4.7. Total Antioksidan Kapasite (TAS)

Toplam Antioksidan Durum (TAS) düzeyleri kolorimetrik olarak, Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) ticari kitleri kullanılarak ölçüldü. Yöntem reaktif–numune oranları korunarak 96 kuyucuklu mikroplaka formatına uyarlandı. Yöntem:

Ölçüm Dalga Boyu: 660 nm

Ölçüm Tipi: İki zamanlı (A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub>)

Absorbans değişimleri:  $\Delta A_2 - \Delta A_1$

*Hesaplama Formülü:*

(Eşitlik 3)

TAS (mmol Trolox Eq/L) =  $(\Delta A_{H_2O} - \Delta A_{Numune} / \Delta A_{H_2O} - \Delta A_{Std})$

### 2.4.8. Serum ve Ekstraktlarda Total Oksidan Kapasite (TOS)

Toplam Oksidan Durum (TOS) düzeyleri kolorimetrik olarak, Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) ticari kitleri kullanılarak ölçüldü. Yöntem reaktif–numune oranları korunarak 96 kuyucuklu mikroplaka formatına uyarlandı. Kit içeriği;

Ölçüm Dalga Boyu: 530 nm

Ölçüm Tipi: Tek zamanlı absorbans ölçümü

Absorbans değerleri: A\_Standart ; A\_Örnek

Hesaplama Formülü:

(Eşitlik 4)

TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eq/L) =  $(A_{\text{Örnek}} / A_{\text{Standart}}) \times \text{Standart Konsantrasyonu}$

## 2.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

### 2.5.1. Paraoksonaz-1 (PON1) aktivitesi,

Paraoksonaz aktivite kiti (REL Assay Diagnostics, *Gaziantep, Türkiye*) kullanılarak serum örneklerinde ölçüldü. Yöntem, kalsiyum iyonları varlığında PON1 enziminin paraoksonu (O,O-diethyl O-p-nitrophenyl phosphate) p-nitrofenole hidrolize etmesine dayanır. Oluşan p-nitrofenolün miktarı, 37 °C’de mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO, ABD) kullanılarak 405 nm dalga boyunda kinetik olarak izlendi. Kinetik okuma toplam 3 dk boyunca 30 saniye aralıklarla yapıldı. Kit içeriği R1 (Tampon) ve R2 (Paraoxon) oluşmaktadır.

Kör Kontrol ve Numune için kendi kuyuklarına 15  $\mu\text{L}$  + R1 (300  $\mu\text{L}$ ) + R2 (15  $\mu\text{L}$ ) konur. 412 nm dalga boyunda okuma kinetik enzimatik okuma yapılır.

PON aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{PON Aktivitesi (U/L)} = (\Delta A/dk \times V_t) / (\epsilon \times l \times V_s) \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Formüldeki Bileşenler:

- $\Delta A/dk$ : Dakikadaki absorbans değişimi
- $V_t$ : Toplam reaksiyon hacmi (mL)
- $\epsilon$ : p-nitrofenolün molar absorptivitesi ( $18.290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- $l$ : Küvet yolu (cm)
- $V_s$ : Numune Serum hacmi (mL)

Absorbsanstaki değişim 3 dakika boyunca her 30 saniyede bir kaydedilmiştir. Örnekler 3 tekrar olarak çalışıldı. Sonuçlar U/L olarak verildi. Enzim aktivitesi, kinetik eğrinin lineer kısmından elde edilen dakika başına absorbsans değişimi ( $\Delta A/dk$ ) kullanılarak hesaplandı ve kitte belirtilen faktör (3445) yardımıyla litre başına ünite (U/L) olarak ifade edildi. Bir ünite PON1 aktivitesi, reaksiyon koşulları altında dakikada 1  $\mu\text{mol}$  paraoksonu p-nitrofenole hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır

### 2.5.2 Arilesteraz Enzim Aktivite Tayini:

Serum PON1 enzimi paraoxondan başka ayrıca fenilasetatı hidrolize ederek fenol ve asetata ayırma yeteneğine sahiptir. Oluşacak fenolün 270 nm'dek göstereceği absorbans, serum PON1'in arilesteraz aktivitesi ile doğru orantılı olacaktır. Yönerge Altındağ ve arkadaşlarından (2007) modifiye edildi. Aktivite ölçümü için taze olarak, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.00), 2 mM  $\text{CaCl}_2$  ve 2 mM fenilasetat içeren bir substrat hazırlandı. Aktivite ölçümleri, köre karşı kinetik okuma yapılan Multiscan Go (Thermofisher ABD) cihazında 37 °C'de, 270 nm dalga boyunda 2.30 (150 sn) dakika süreyle 30 saniye aralıkla gerçekleştirildi ve delta absorbans kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı.

$$\text{ARE Aktivitesi (U/L)} = (\Delta A/dk \times V_t) / (\epsilon \times l \times V_s) \quad (\text{Eşitlik 6})$$

Formüldeki Bileşenler:

- $\Delta A/dk$ : Dakikadaki absorbans değişimi
- $V_t$ : Toplam reaksiyon hacmi (mL)
- $\epsilon$ : Fenolün molar absorptivitesi ( $1.310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- $l$ : Küvet yolu (cm)
- $V_s$ : Serum hacmi (mL)

### 2.5.3. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivite tayini Goth yönteminin 96 kuyucuklu mikropalakaya modifikasyonu ile gerçekleştirildi (Goth, 1991). 60 mmol/L sodyum potasyum fosfat tamponu (pH=7.4), hazırlandı ve deneyin yapılacağı gün taze olarak mL başına 65 µmol hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile karıştırılarak substrat oluşturuldu. Kuyucuklara Kör/Standart/numune olarak 40 µL pipetlendi. Üzerine 20 µL substrat ilave edildi. 37 °C de 60 saniye inkübasyonun ardından reaksiyon µL 32.4 mmol/L amonyum molibdat ile sonlandırıldı. 405 nm dalga boyunda mikropalakada okundu. Aktivite şu şekilde hesaplandı:

Kör 1 : 100 µL substrat, 100 µL amonyum molibdat ve 20 µL serum

Kör 2: 100 µL substrat, 100 µL amonyum molibdat ve 20 µL tampon çözeltisi

Kör 3: 100 µL tampon + 100 µL amonyum molibdat ve 20 µL tampon

$$\text{Katalaz aktivitesi (kU/L)} = \frac{\text{Abs (numune)} - \text{Abs(Kör1)}}{\text{Abs (Kör2)} - \text{Abs (Kör3)}} \times 271 \quad (\text{Eşitlik 7})$$

### 2.5.4. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini

MPO enzim aktivitesi Bradley yönteminden modifiye edilerek yapıldı (Bradley vd., 1982). Kısaca: MPO analizi 50 µL serum+ekstrakt, 0,167 mg/ml konsantrasyonunda o-dianisidin dihidroklorür içeren 50 mM fosfat tamponununun 1428 µL'si (pH 6,0) ile karıştırıldı. Son aşamada kuvartz küvet içine 21,4 µL %0,0005 hidrojen peroksit eklendi. Absorbansın 460 nm'deki değişimi 0-150 sn arasında kinetik olarak köre karşı ölçüldü. Sonuç U/L olarak verildi. Aşağıdaki formüle göre aktivite hesaplandı. MPO aktivitesinin hesaplanması :

$$\text{MPO (U/L)} = [ (\Delta A / dk \times V_t \times 10^6) / (\epsilon \times l \times V_s) ] \quad (\text{Eşitlik 8})$$

Burada:

$\Delta A / dk$  \_Absorbans farkı / dakika (zaman)

$V_t$  : Toplam reaksiyon hacmi (L)

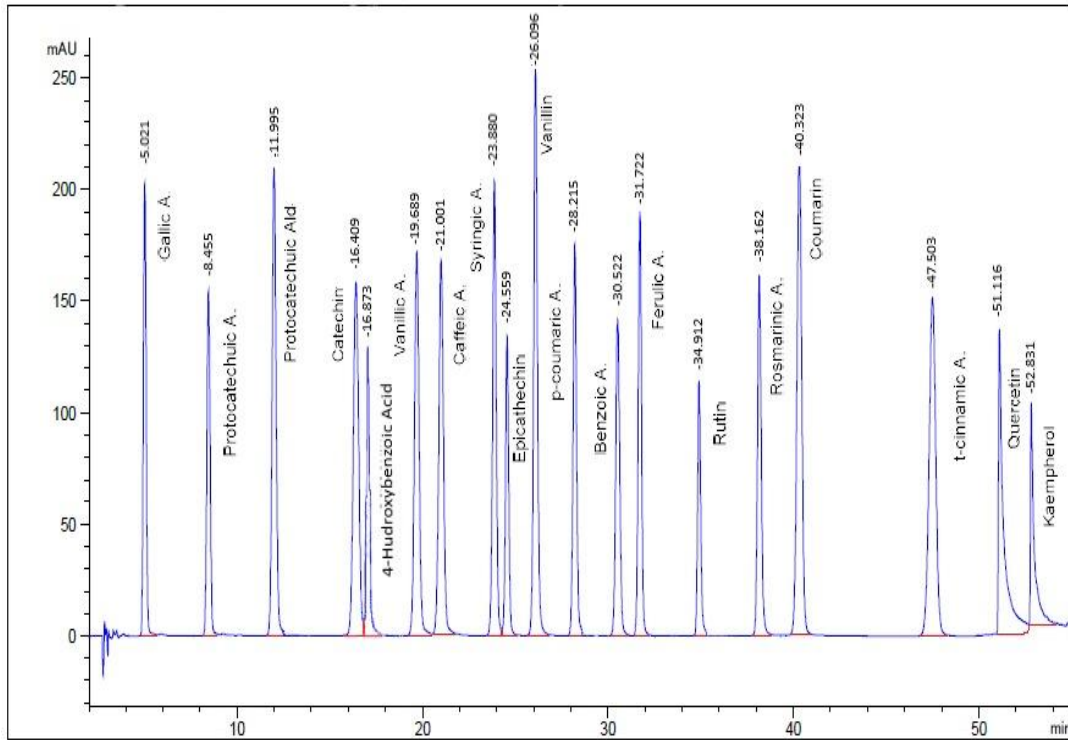
$V_s$  : Numune hacmi (mL)

$\epsilon$  : Oksitlenmiş o-dianisidin için molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 460 nm)

$l$  : Optik yol uzunluğu ( 1 cm)

## 2.6. HPLC Fenolik Bileşik Analizi

Karadut örneklerinin fenolik içerik analizleri Gümüşhane Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Araştırma ve Uygulama Merkezinde Paje vd, 2022 yöntemine göre gerçekleştirildi (Paje vd., 2022). Polifenolik bileşik analizi için Agilent marka, 1260 Infinity model HPLC sistemi kullanıldı. Sistem; G1311C/1260 Quat Pump VL model gradient pompa, G1329/1260 ALS model otomatik örnekleyici, G1316A/1260 TCC model kolon fırını ve G1315D/1260 DAD VL model dedektörten oluşmaktadır. Analiz için Macherey-nagel marka, EC 250x4.6 nucleosil 100-5, 5 µm C18 HD kolon kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 27 °C'ye ayarlandı. Hareketli faz olarak ultra saf su (faz A), %100 acetonitril (faz B), %3 asetik asit/ultra saf su (faz C) ve %3 asetik asit + %25 acetonitril+ ultra saf su (faz D) kullanıldı. HPLC gradiyent profili %10-20 D/%90-80 C (0-10 dk.), %20-30 D/%80-70 C (10-17 dk.), %30-50 D/% 70-50 C (17-22 dk.), %50-80 D/%50-20 C (22-32 dk.), %20 D/%80 C (32-40 dk.), %80-20 D/%20-0 C/% 0-80 B (40-45 dk.), %20 D/%80 B (45-50 dk.), %20-10 D/%0-90 C/% 80-0 B (45-50 dk.), %10 D/%90 C (55-60 dk.), olacak şekilde, mobil faz akış hızı 0.8 ml/dk. ve enjeksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde metod oluşturuldu. Fenolik içerik analizine ait HPLC Standart kromatogramı şekil 16 da verilmiştir.



Şekil 16. HPLC Polifenolik bileşik standart kromatogramı

Tablo 4. HPLC Analitik Metot Validasyon Parametreleri

No	Analytes	RT	Correlation	$r^2$	$RSD_R\%$		Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (mg/L)	Recovery (%)
					Interday	Intraday			
1	Gallic Acid	5.021	$y=171.892x - 16.386$	0.995	2.18	1.52	5-100	1.27/4.22	100.0
2	Protocatechuic Acid	8.455	$y=- 34.326x - 3.408$	0.999	1.30	0.63	5-100	0.80/2.65	99.8
3	Protocatechuic Aldehyde	11.995	$y=- 164.513x + 20.025$	0.999	2.42	1.48	5-100	1.02/3.39	99.8
4	Catechin	16.409	$y=5.359x - 63.413$	0.999	1.24	0.81	5-100	1.68/5.48	100.1
5	4-Hydroxybenzoic Acid	16.873	$y=- 36.111x - 8.048$	0.999	1.30	1.02	5-100	2.03/6.78	99.6
6	Vanillic Acid	19.689	$y=- 39.531x + 9.3444$	0.998	2.11	1.09	5-100	1.31/4.36	99.7
7	Caffeic Acid	21.001	$y=-78.796x - 11.629$	0.971	2.42	0.93	5-100	1.25/4.18	99.6
8	Syringic Acid	23.880	$y=- 71.521x + 6.906$	0.998	1.18	0.63	5-100	0.75/2.50	99.7
9	Sesamol	24.155	$y= 23.118x - 26.735$	0.999	2.11	1.25	5-100	0.51/1.71	100.1
10	Epicatechin	24.559	$y=-17.582x + 5.666$	0.999	2.11	1.08	5-100	0.50/1.65	100.2
11	Vanillin	26.096	$y=- 95.730x + 4.534$	0.998	2.18	1.09	5-100	0.41/1.37	99.7
12	p-Coumaric Acid	28.215	$y= 119.591x - 12.267$	0.999	2.40	1.16	5-100	0.91/3.04	99.7
13	Benzoic Acid	30.522	$y=-9.716x - 2.535$	0.999	2.40	0.51	5-100	1.41/4.71	100.1
14	Syringaldehyde	31.455	$y=- 53.674x + 4.475$	0.998	2.18	1.16	5-100	0.76/2.54	100.0
15	Ferulic Acid	31.722	$y=-68.387x - 32.358$	0.997	2.18	1.22	5-100	0.77/2.56	99.6
16	Rutin	34.912	$y=- 16.562x - 2.353$	0.998	1.92	0.76	5-100	1.26/4.19	100.2
17	Rosmarinic Acid	38.162	$y=- 40.241x - 1.551$	0.996	1.47	0.62	5-100	0.32/1.07	100.1
18	Coumarin	40.323	$y=-101.687x + 17.691$	0.998	1.47	0.73	5-100	0.47/1.55	99.6
19	t-cinnamic Acid	47.503	$y=- 194.844x - 25.077$	0.998	2.12	1.48	5-100	1.24/4.15	99.7
20	Quercetin	51.116	$y=- 27.251x - 1.527$	0.999	1.94	0.97	5-100	0.71/2.33	100.3
21	Kaempferol	52.831	$y= 15.443x - 0.862$	0.998	2.40	0.57	5-100	0.59/1.97	100.0
22	Crysin	52.969	$y=68.444x - 1.762$	0.957	1.92	0.76	5-100	0.50/1.67	99.7

RT: Retention Time, LOD: Limit of detection, LOQ Limit of Quantitation

## 2.7. İstatistik

İstatistiksel olarak sulu ve etanolik ekstraktların grup içi karşılaştırmaları amacıyla ANOVA ve Duncan testleri kullanıldı. ANOVA, Varyans Analizi, XLSTAT (Addinsoft, 2024, XLSTAT istatistiksel ve veri analizi çözümü, New York, ABD) yardımıyla Microsoft Excel kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Fenolik Madde ve Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları

Karadut ve ekstraktlarının fenolik ve flavonoid madde analizlerine ait veriler ve Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Karadut etanolik ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik içerik (TPC) ve toplam flavonoid madde Miktarı (TFC) sonuçları.

Ekstraktlar	TPC (mg /g GAE )	TFC (mg / g QE)
Etanolik Karadut Ekstraktı	27.99 ± 1.31*	43.33± 1.59*
Sulu Karadut Ekstarktı	11.69 ± 0.66	19.76 ± 1.12

**TPC:** Toplam fenolik içerik; **TFC:** Toplam flavonoid içerik. \*:Sulu ekstrakt ile kıyaslandığında p<0.001

Tablo 5 da görüldüğü gibi etanolik ekstraktın hem total fenolik içeriği hem de toplam flavonoid madde miktarının sulu ekstrakta göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir (p<0.001).

#### 3.2. Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları

Antioksidan aktivitenin tespitine yönelik analiz sonuçları tablo 6’da verilmiştir.

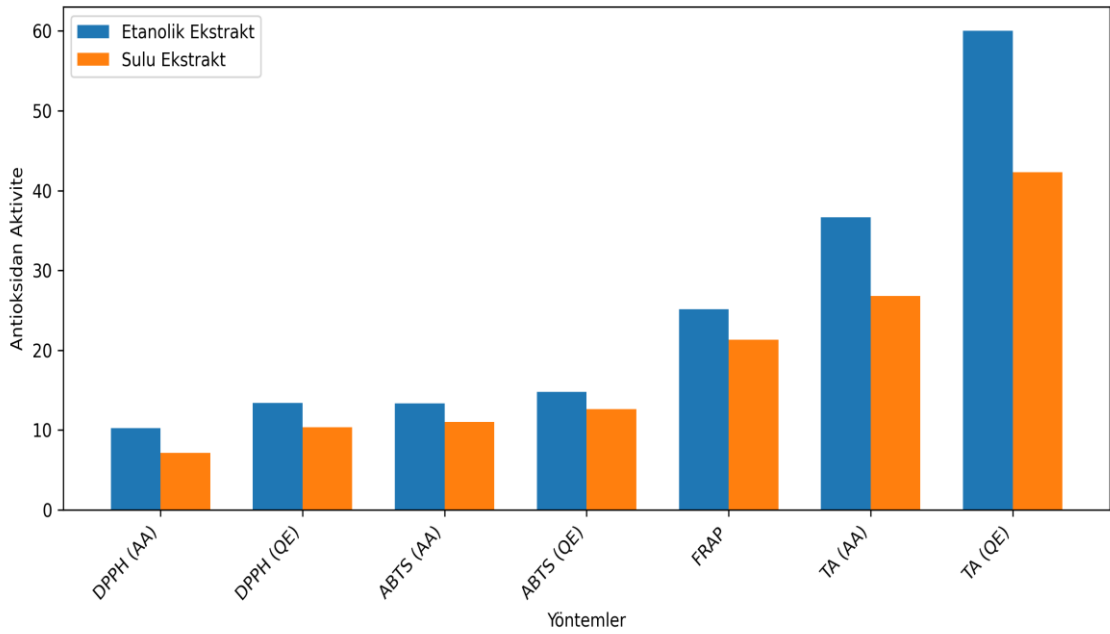
Tablo 6. Antioksidan aktivite analiz sonuçları

Ekstraktlar	DPPH (AA)	DPPH (QE)	ABTS (AA)	ABTS (QE)	FRAP (FeSO4)	TA AA	TA QE
EtOH.	10.25 <sup>a</sup>	13.41 <sup>a</sup>	13,36 <sup>a</sup>	14,79 <sup>b</sup>	25,13 <sup>c</sup>	36,67 <sup>a</sup>	60,00 <sup>a</sup>
Eks.	±0.3	±0.3	±0,22	±0,24	±0,74	±0,50	±0,81
Sulu Eks	7.14	10.36	11,03	12,65	21,32	26,78	42,31
	±0.3	±0.3	±0,29	±0,33	±0,46	±0,49	±0,25

Sulu ekstrak ile karşılaştırıldığında a: p<0.001; b:p = 0.002; c:p = 0.003

Tablo 6’da etanolik ve sulu ekstraktların antioksidan kapasiteleri DPPH, ABTS, FRAP ve toplam antioksidan (TA) yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Tüm analizlerde sonuçlar askorbik asit (AA) ve kuersetin eşdeğeri (QE) cinsinden ifade edildi. Etanolik ekstrakt, DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi açısından sulu ekstrakta kıyasla daha yüksek değerler gösterdi. DPPH-AA ve DPPH-QE sonuçları etanolik ekstrakt için sırasıyla 10.25 ± 0.3 ve 13.41 ± 0.3 olarak bulunurken, sulu

ekstraktın değerleri  $7.14 \pm 0.3$  ve  $10.36 \pm 0.3$  olarak ölçüldü ( $p < 0.001$ ). Benzer şekilde, ABTS radikal katyon süpürme kapasitesi etanolik ekstraktta daha yüksek saptanmış olup, ABTS-AA ve ABTS-QE değerleri sırasıyla  $13.36 \pm 0.22$  ve  $14.79 \pm 0.24$  olarak tespit edildi. Sulu ekstrakt için bu değerler  $11.03 \pm 0.29$  ve  $12.65 \pm 0.33$  (sırası ile  $p < 0.001$  ve  $p = 0.002$ ) olarak bulundu. FRAP indirgeme gücü analizinde de etanolik ekstraktın sulu ekstraktta göre daha yüksek demir indirgeme kapasitesine sahip olduğu görüldü; FRAP değeri etanolik ekstrakt için  $25.13 \pm 0.74$  FeSO<sub>4</sub> eşdeğeri, sulu ekstrakt için ise  $21.32 \pm 0.46$  FeSO<sub>4</sub> eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. Sulu ve etanolik bitki ekstraktlarının DPPH, ABTS, FRAP ve toplam antioksidan (TA) yöntemleri ile belirlenen antioksidan aktivite grafiği

Toplam antioksidan kapasite TA-AA ve TA-QE sonuçları da etanolik ekstraktta sulu ekstraktta göre anlamlı derecede daha yüksekti ( $p < 0.05$ ). Genel olarak değerlendirildiğinde, kullanılan tüm antioksidan analiz yöntemlerinde etanolik ekstraktın sulu ekstraktta kıyasla daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu görüldü.

### 3.3 Enzim Aktiviteleri

Sulu ve etanolik karadut ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda enzim ve oksidan/antioksidan etkileri aşağıda Tablo 7 'de gösterilmiştir. PON aktivite grafiğinde, hem sulu hem de etanolik ekstrakt gruplarında konsantrasyon artışı ile paralel olarak aktivitesinde kademeli bir azalma olduğu görülmektedir. Bu azalma eğilimi, özellikle

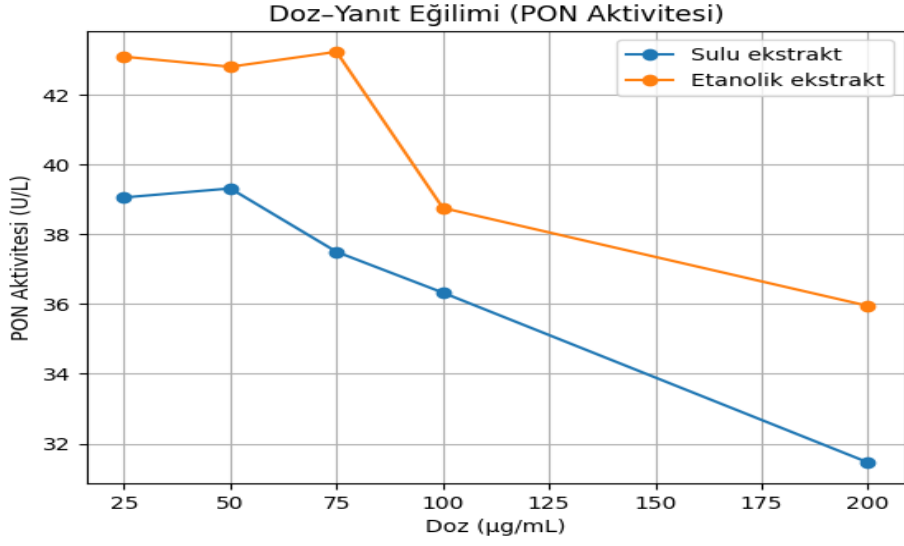
100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında daha belirgin hale gelmektedir. En düşük PON aktivite değerinin 200 µg/mL sulu konsantrasyonda ( $31.46 \pm 1.18$ ) olduğu görülmektedir. Aktivitelerin karşılaştırmalı sütun grafiği Şekil 18 ve 19’da verilmiştir.

Tablo 7. Sulu ve etanolik karadut ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda enzim ve oksidan/antioksidan etkileri

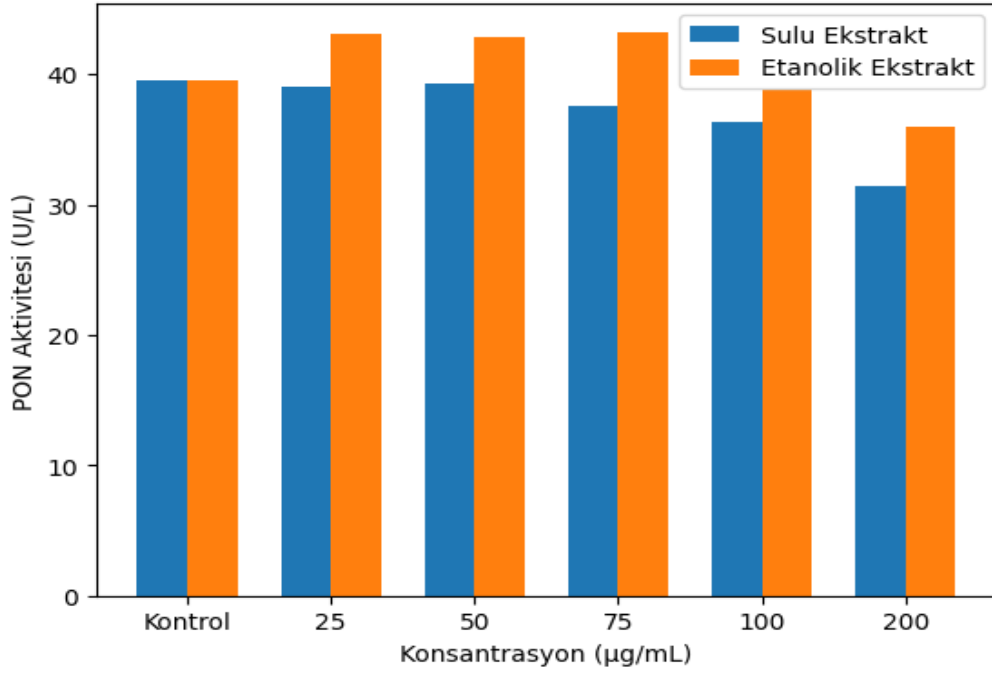
Örnek µg/mL	TAS mmol Trolox Eq/L	TOS µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eq/L	PON1 (U/L)	ARE (U/L)	Katalaz (U/mL)	MPO (U/L)
Kontrol	$3.10 \pm 0.01^c$	$6.70 \pm 0.13^a$	$39.46 \pm 1.55^{bc}$	$2215.50 \pm 37.50^a$	$55.90 \pm 9.15^c$	$12.05 \pm 0.75^{ab}$
Etanolik 25	$3.28 \pm 0.23^{bc}$	$4.06 \pm 0.33^b$	$43.10 \pm 2.07^{ab}$	$1693.33 \pm 43.20^b$	$69.20 \pm 2.00^c$	$12.40 \pm 1.40^a$
Etanolik 50	$3.39 \pm 0.06^{bc}$	$4.62 \pm 0.09^b$	$42.81 \pm 0.80^{ab}$	$1501.50 \pm 47.50^c$	$102.35 \pm 4.45^b$	$10.80 \pm 1.30^b$
Etanolik 75	$3.49 \pm 0.06^{bc}$	$4.34 \pm 0.32^b$	$43.24 \pm 2.75^{ab}$	$1365.67 \pm 56.00^{cd}$	$98.50 \pm 11.10^b$	$10.13 \pm 1.07^b$
Etanolik 100	$3.73 \pm 0.41^b$	$4.38 \pm 0.17^b$	$38.76 \pm 2.39^{bc}$	$1123.67 \pm 84.60^c$	$82.45 \pm 11.15^{bc}$	$10.90 \pm 1.20^b$
Etanolik 200	$4.05 \pm 0.16^{ab}$	$3.90 \pm 0.14^b$	$35.95 \pm 2.52^c$	$1140.00 \pm 98.00^c$	$109.75 \pm 10.65^b$	$13.55 \pm 2.35^a$
Su 25	$3.56 \pm 0.51^b$	$4.05 \pm 0.02^b$	$39.06 \pm 1.09^{bc}$	$2005.00 \pm 205.00^a$	$99.87 \pm 10.23^b$	$10.90 \pm 0.70^b$
Su 50	$4.11 \pm 0.26^a$	$4.65 \pm 0.03^b$	$39.32 \pm 5.60^{bc}$	$1731.33 \pm 78.50^b$	$97.50 \pm 7.25^b$	$9.61 \pm 0.79^c$
Su 75	$4.00 \pm 0.05^a$	$4.17 \pm 0.03^b$	$37.50 \pm 1.20^c$	$1648.33 \pm 67.00^{bc}$	$65.50 \pm 10.90^c$	$8.10 \pm 0.70^c$
Su 100	$4.18 \pm 0.09^a$	$4.47 \pm 0.02^b$	$36.33 \pm 4.90^c$	$1443.33 \pm 190.00^{cd}$	$96.43 \pm 8.05^b$	$13.20 \pm 1.10^a$
Su 200	$4.38 \pm 0.12^a$	$4.05 \pm 0.02^b$	$31.46 \pm 1.18^d$	$1426.00 \pm 123.00^{cd}$	$121.70 \pm 15.40^a$	$7.50 \pm 1.40^c$

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır (Duncan,  $p < 0.05$ ). (ortalama  $\pm$  standart sapma,  $n = 3$ ) **PON**:Paraoksonaz;**TAS**:Total antioksidan status; **TOS**:Total oksidan status;**ARE**:Ariesteraz aktivitesi; **KAT**:Katalaz aktivitesi; **MPO**: Miyeloperoksidaz aktivitesi

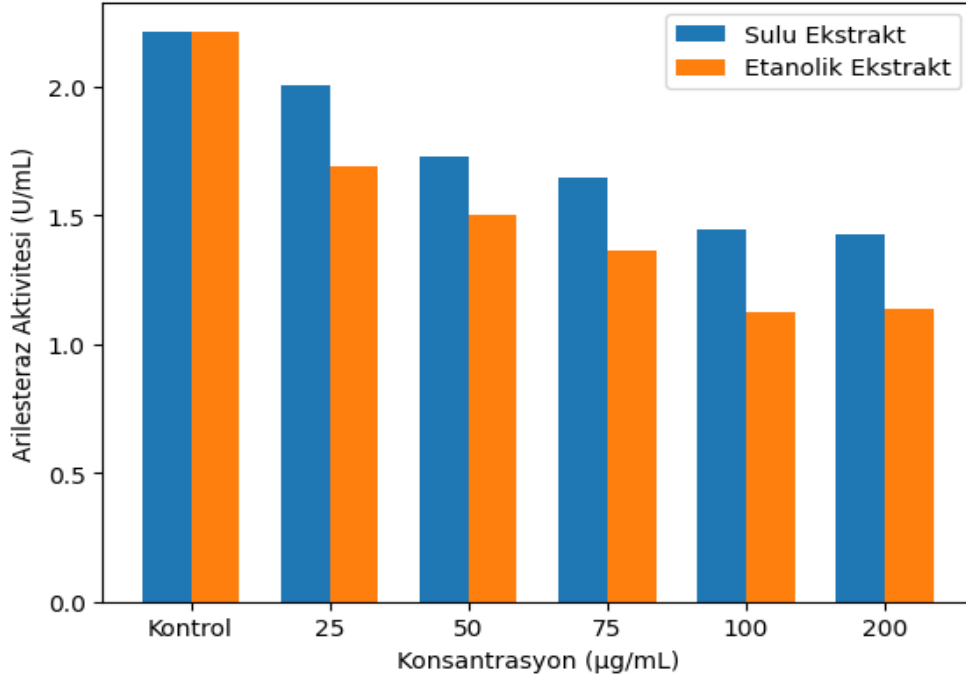
PON aktivitesinde sulu ekstraktlarda azalma durumu söz konusu iken 25-75 arası etanolik ekstraktlar da tam tersine kontrol grubuna göre ılımlı bir artış olduğu görülmektedir. Bununla beraber bu artış anlamlı görülmemektedir. Sulu ve etanolik ekstraktların aynı konsantrasyonları ele alındığında PON1 aktivitesi açısından etanolik ekstraktların daha yüksek aktiviteye neden olduğu ortadadır (Şekil 19).



Şekil 18. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının PON aktivitesi üzerine etkisi

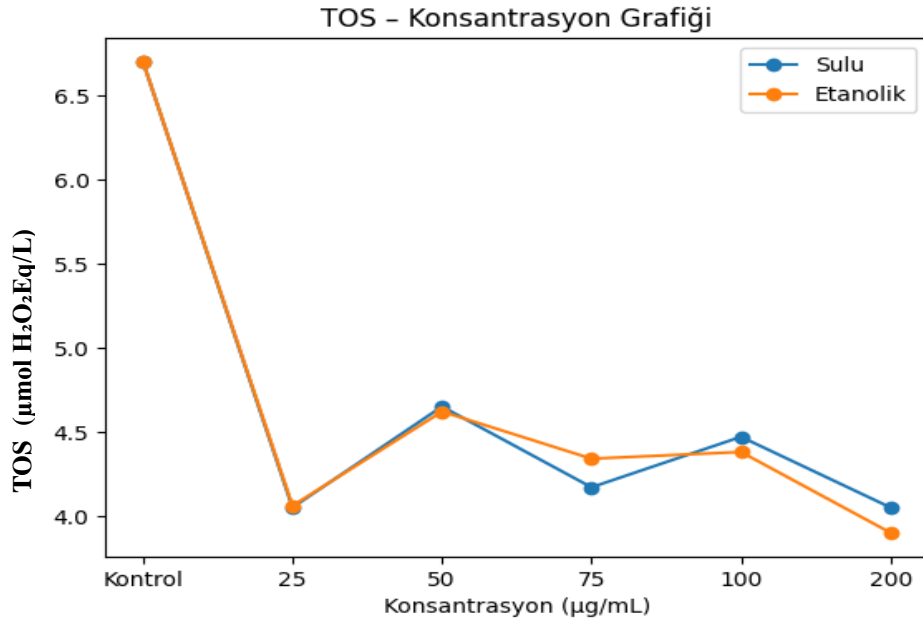


Şekil 19. Ekstraktlara göre PON aktivitesi



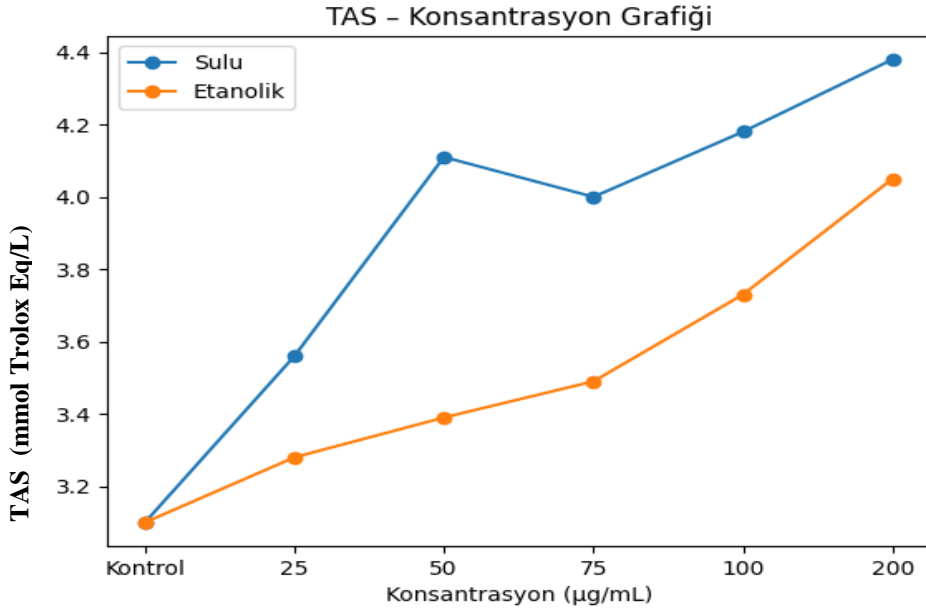
Şekil 20. Ekstraktlara göre ARE aktivitesi

PON1 aktivitesinin tersine sulu ekstraktların aynı konsantrasyondaki etanolik ekstraktlara göre daha yüksek ARE aktivitesine etki ettiği görülmektedir (Şekil 20).

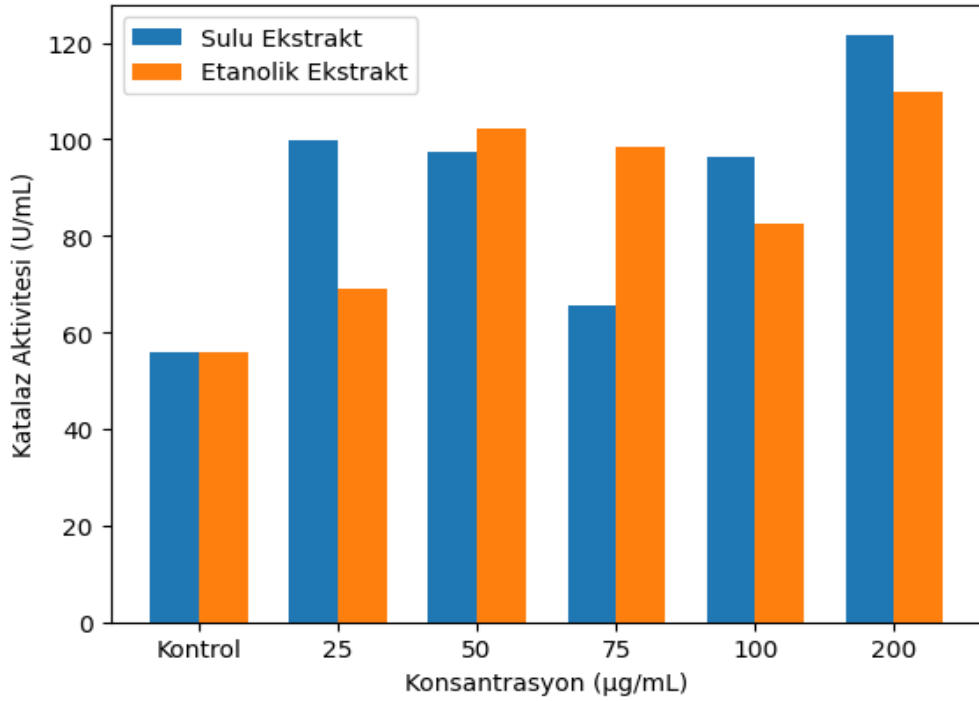


Şekil 21. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının TOS etkisi

Şekil 21'de serum sulu ve etanolik ekstrakt içeriklerinin TOS değerlerinin paralel biçimde hareket ettikleri görülmektedir.



Şekil 22. Kontrol serumu ile karşılaştırıldığında sulu ve etanolik ekstraktların farklı konsantrasyonlarının TAS etkisi



Şekil 23. Ekstraktlara göre katalaz (KAT) aktivitesi

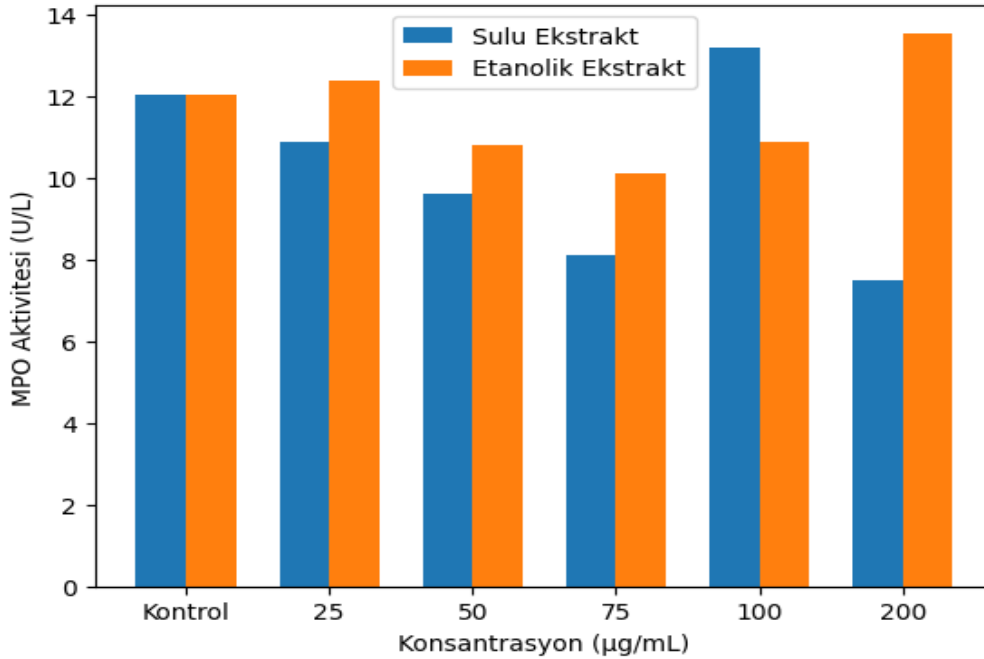
Arilesteraz aktivite grafiğinde, sulu ve etanolik ekstraktların artan konsantrasyonlarına bağlı olarak ARE aktivitesinde doz bağımlı bir düşüş gözlenmektedir. Etanolik ekstrakt gruplarında, aynı konsantrasyonlarda sulu ekstraktlara kıyasla daha düşük ARE aktivite değerleri izlenmektedir. Her iki grubun

Katalaz aktivite grafiğinde, hem sulu hem de etanolik ekstrakt gruplarında tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla artmış katalaz aktivitesi dikkat

çekmektedir. Özellikle orta ve yüksek konsantrasyonlarda katalaz aktivitesindeki artış daha belirgin görünmektedir. 25 µg/mL sulu ekstrakt haricinde tüm ekstraktlar kontrol grubundan farklılık göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

TAS değerlerinin sulu ekstraktlarda kontrol grubuna göre etanolik ekstraktlara göre daha fazla arttığı tespit edildi. Artışın büyük oranda ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Total oksidan durumda (TOS) ise tersi bir durum söz konusudur ve kontrol grubuna göre TOS değerleri azalmakla beraber ekstraktlarda TAS'a göre daha stabil bir durum görülmektedir. Bununla beraber tüm ekstraktların TOS için kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşük değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21 ve Şekil 22).

Miyelopeoroksidaz (MPO) aktivitesinin özellikle etanolik ekstraktlarda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. En yüksek konsantrasyonda (200 µg/mL etanolik ekstrakt) ise yeniden belirgin bir artış göstermekte idi.



Şekil 24. Ekstraktlara göre Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi

### 3.4. HPLC Analizi:

#### 3.4.1. Fenolik İçerik Analizi

Ekstraktlarda fenolik içeriğe ait veriler Tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8. HPLC analizi sonucunda sulu ve etanolik karadut ekstraktlarında tespit edilen fenolik bileşikler.

Bileşen	Sulu Ekstrakt ( $\mu\text{g/g}$ )	Etanolik Ekstrakt ( $\mu\text{g/g}$ )
Gallik Acid	57,22724	73,42
P. Kumarik Asid	9,011796	43,06
Kateşin	73,72121	220,95
Rutin	134,6429	130,87
Ferulik Acid	14,41338	32,99
Protokatekuik Acid	-	493,21
Kafeik Asit	-	124,72

Tablo 8’de görüldüğü üzere sulu ekstraktta 5, etanolik ekstraktta ise 7 fenolik bileşik tespit edilmiştir. Sulu ekstraktta en yüksek miktarda fenolik bileşik olarak rutin, etanolik ekstraktta ise ptotokatekuik asit bulunmuştur. Bu bileşikleri sırası ile kateşin ve kafeik asit takip etmektedir. Protokatekuik acid ve kafeik asit sulu ekstraktlarda tespit edilemezken etanolik ekstraktlarda görülmüştür.

#### 4. TARTIŞMA

İnsan vücudunda metabolizma sırasında çok yüksek sayıda kimyasal reaksiyon meydana gelir. Hücreler yaşayabilmek için enerji üretmek zorundadırlar ve enerjinin başlıca üretim noktası mitekondrilerdir. Mitokondriyal oksijenli solunum, hücresel enerji üretiminin temelini oluştururken aynı zamanda hücre içi oksidan-antioksidan dengenin belirlenmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidrosil radikali gibi ROS türleri fizyolojik koşullarda hücresel sinyal iletimi ve adaptif yanıtların düzenlenmesine katkı sağlarken, yüksek konsantrasyonlarında veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda oksidan-antioksidan dengenin bozulması ve oksidan lehine kayması sonucu oksidatif stres gelişebilmektedir (Özcan vd., 2015).

Bitkiler fitokimyasal olarak adlandırılan ve bitkinin oldukça farklı kısımlarından elde edilebilen kimyasal ürünler üretirler. Bu ürünler içinde sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasal maddeler tıp, gıda, kozmetik gibi farklı alanlarda oldukça önemli derecede endüstriyel alana sahiptir (Acıbuca ve Budak, 2018).

Paraoksonaz (PON1) lipoprotein metabolizmasında HDL ile birlikte ateroskleroz gelişimine karşı farklı mekanizmalar ile koruyucu rol oynar. Çeşitli çalışmalarda PON1 aktivitesinin HDL miktarı ile ilişkili olmakla beraber HDL türleri (HDL2, HDL3, disfonksiyonel HDL) inflamasyon, fosfolipid içeriği ve dolaşımdaki diğer lipoprotein metabolizması ile ilişkili enzim ve reseptörlerle de alakalı olabileceği ifade edilmektedir (Loured vd., 2012).

Çalışmamızda sulu ekstraktın artan konsantrasyonlarda PON1 aktivitesini konsantrasyona bağımlı olarak azalttığı, bu etkinin özellikle hem sulu hem de etanolik ekstraktların 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında belirgin hale geldiği görülmektedir. Bu durum PON1 aktivitesinin ekstrakt çeşidine ve konsantrasyona bağlı olarak görülmektedir. Düşük ve orta konsantrasyonlarda (25–75 µg/mL) PON1 aktivitesi kontrol grubuna yakın veya hafif artmış düzeylerde seyrederken, yüksek konsantrasyonlarda (özellikle 100 ve 200 µg/mL) her iki ekstrakt grubunda da belirgin bir azalma tespit edildi. Bu durum, ekstraktların düşük dozlarda enzim aktivitesini koruyucu veya destekleyici etki gösterebileceğini, ancak yüksek dozlarda inhibe edici bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sulu ekstraktlar düşük konsantrasyonlarda PON aktivitesini düşürürken bu düşüş anlamlı fark göstermemekte ancak 100 µg/mL konsantrasyonda anlamlı dramatik bir düşüş görülmektedir (p<0.05). 100 ve 200 µg/mL

konsantrasyonlarda PON aktivitesi belirgin fark göstermemektedir. Bu durum 100 µg/mL konsantrasyonda enzim aktivitesindeki düşüşün doygunluğa ulaştığı şeklinde değerlendirilmektedir. Kirit ve Işık (2020), çalışmamıza benzer şekilde farklı tıbbi bitkilerin serum PON aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda sulu ekstraktların etkilerine bakmışlar ve benzer şekilde PON aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. Sulu ekstraktın artan konsantrasyonlarda PON1 aktivitesini doz-bağımlı olarak azaltması, ekstraktın içerdiği hidrofilik fenolik bileşiklerin veya oksidan özellik gösterebilen sekonder metabolitlerin enzim-substrat etkileşimini baskılaması ya da PON1'in HDL üzerindeki fonksiyonel konformasyonunu olumsuz etkilemesi ile ilişkili olabilir. Bu inhibisyon özellikle 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında belirginleşmiş olması yüksek dozlarda artan fenolik içeriğin enzim üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, etanolik ekstraktların sulu ekstraktlara göre PON1 aktivitesini daha stabil olarak tutması ve daha az oranda düşürmesi, lipofilik antioksidan bileşenlerin HDL-PON1 kompleksini stabilize etmesi, enzimin aktif bölgesini oksidatif modifikasyonlardan koruması veya substrat erişilebilirliğini artırması ile açıklanabilir (Jakubowski 2024; Otocka-Kmiecik 2022). Ancak etanolik ekstrakt konsantrasyonu arttıkça bu koruyucu etkinin ortadan kalkması ve 100–200µg/mL aralığında PON1 aktivitesinin yeniden azalması, yüksek dozlarda lipofilik bileşiklerin enzim üzerinde inhibe edici veya membran-benzeri mikroçevrede bozucu etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Paraoksonaz aktivitesine paralel olarak arilesteraz aktivitesi de ekstrakt konsantrasyonlarına bağlı olarak düşüş göstermiştir. Serum PON1 arilesteraz aktivitesi, genetik polimorfizmlerden görece bağımsız olması nedeniyle enzimin fonksiyonel kapasitesinin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif stresle ilişkili patofizyolojik süreçlerin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Bhattacharyya vd., 200). Bununla beraber karadutun sulu ve etanolik ekstraktların literatürde belirtilen antioksidan özelliklerine rağmen, serum PON1 arilesteraz aktivitesinde doz bağımlı bir azalma gözlenmiştir (Loued vd., 2012). Bu durum, ekstrakt bileşenlerinin PON1 enzimi ile doğrudan etkileşime girerek fonksiyonel inhibisyona yol açmasıyla açıklanabilir. İn vitro koşullarda gözlenen bu etkinin, PON1'in oksidatif hasardan korunmasına yönelik uzun dönemli in vivo etkilerden farklı mekanizmalarla ortaya çıktığı ve in vivo koşullarda metabolik süreçler tarafından modüle edilebileceği düşünülmektedir. Ekstrakt bileşenlerinin PON1 ile doğrudan etkileşimi, Ca<sup>2+</sup> bağımlı katalizin modülasyonu veya ölçüm düzeyinde olası

interferanslar ile ilişkili fonksiyonel inhibisyonundan kaynaklanmış olabilir (Sirca vd., 2024).

Karadut meyvesinin sulu ekstraktlarında gallik asit, p-koumarik asit, kateşin, rutin ve ferulik asit gibi fenolik bileşiklerin tespit edilmesi, çalışmamızda gözlenen antioksidan biyokimyasal yanıtları açıklamaktadır. Bu bileşiklerin güçlü radikal süpürücü ve metal şelatlayıcı özellikleri, toplam antioksidan kapasitedeki artış ve TOS düzeylerindeki azalma ile uyumludur. Ayrıca gallik ve ferulik asit gibi fenoliklerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizmasını destekleyerek katalaz aktivitesini artırabileceği bildirilmiştir. Buna karşın kateşin ve rutin gibi flavonoidlerin, Ca<sup>2+</sup> bağımlı PON1 enzimi ile doğrudan etkileşime girerek in vitro koşullarda paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinde fonksiyonel inhibisyona yol açabileceği düşünülmektedir (Koç vd., 2025). TAS, sulu ekstraktın kontrole göre tüm konsantrasyonlarında artış görülmüştür. En yüksek değer 200 µg/mL (4.38 ± 0.12 mmol Trolox Eq/L) olarak saptanmıştır ve bu durum artışın genel olarak doz bağımlı bir eğilim gösterdiğine işaret etmektedir. Etanolik ekstraktlarda ise TAS değerleri sulu ekstraktlarla kıyaslandığında daha düşük kalmakla beraber kontrol grubuna göre artış göstermiştir. En yüksek değer 200 µg/mL (4.05 ± 0.16) düzeyindedir. Gerek TAS artışı gerekse TOS düzeylerinde düşüş ekstraktların antioksidan özelliklerinin güçlü olduğunu, fakat yüksek konsantrasyonlarda bazı enzimatik aktiviteler üzerinde baskılayıcı etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde farklı metotlar kullanılmaktadır. Bu seçilen numunenin ve ekstraksiyon özelliklerinin durumuna göre değişkenlik gösterebilmektedir. Ekstraksiyon yöntemlerinin içeriğin eldesi açısından oldukça etkili olduğu ifade edilmektedir. Örneğin antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan ekstrakt hazırlama yöntemleri altivite ile doğrudan ilişkili olabilmektedir (Do vd., 2014; Darak vd., 2024; Kılınç vd., 2025). Dolayısı ile bu durum enzim aktivitelerine yansiyabilir.

Katalaz enziminin fenolik bileşiklerle etkisine yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin Thyagaraju vd., (2008) yaptıkları çalışmada streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda ferulik asidin etkisi ile karaciğer ve testislerdeki oksidatif bozuklukları ortadan kalktığını Katalaz aktivitesinin arttığını göstermiştir. Bununla beraber Kirit ve Işık (2020), çalışmamıza benzer in vitro ortamda yaptıkları çalışmada katalaz aktivitesinin kontrol serumuna göre düşüş gösterdiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ise Katalaz aktivitesi kontrol serumuna göre belirgin derecede artış göstermekte idi. Genel olarak bakıldığında TAS TOS ve antioksidan parametreler ile bu çalışmadaki katalaz aktivitesinde artış uyumlu görülmektedir. Bu durum her ne kadar

paradoksal olarak görülse de polifenoller hücrel ortama, yapıya, pH'a, konsantrasyona ve yüksek yük yoğunluğuna sahip geçiş metallerinin (bakır ve demir gibi) ortamda bulunurluğuna bağlı olarak, prooksidan özelliklere sahip olabilir. Flavonoidlerin varlığında, demir Fe<sup>2+</sup>'den Fe<sup>3+</sup>'e oto-oksidlenebilir; bu reaksiyon hidrojen peroksit üretir ve in vitro ortamda katalaz aktivitesini artırır (Perron vd., 2010 ; Dzah vd., 2024). Kateşin ve rutin varlığı, katalazın enzimatik aktivitesindeki artışı açıklayabilir; çünkü kateşin yapısındaki hidroksil gruplarının varlığı, katalazın in vitro aktivitesini artırır (Lotito vd., 2000). Rutinin in vitro kimyasal müdahalesi, pro-oksidan reaksiyonu sınırlandırarak katalaz aktivitesinin inaktivasyonunu önleyebilir ve dolayısıyla aktivitesini artırabilir.

Bu çalışmada bir hastanenin biyokimya laboratuvarından toplanmış ve bir havuz oluşturulmuş serumlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan serum havuzunun antioksidan/oksidan profilinin ön görülemeyen bazı biyolojik şartlardan etkilenmesi olasılığı vardır. Örneğin subklinik infalamsyon, beklemiş serum, artmış bilirubin ihtimali, saklama koşulları, protein (örneğin albümin düzeyi) TAS değerlerini yükseltebilir, TOS'u baskılayabilir (Cao ve Prior, 1998; Erel 2004). Kontrol serumu ile ekstraktları içeren serumlardan elde edilen TAS ve TOS değerleri mutlak klinik parametreler olarak değerlendirilmek yerine ekstraktların konsantrasyona bağlı oluşturduğu değişimler esas alınmıştır. Ekstraktların hem TAS hem TOS hem de katalaz aktiviteleri üzerine etkileri açıklanabilir ve tutarlıdır.

MPO aktivitesinde genel bir azalma eğilimi gözlenmiştir. MPO oksidan üretiminde rol oynar, oksidatif stres ve inflamatuvar ile alakalı bakteriyosidal özelliğe sahip bir enzimdir. Antioksidan bileşiklerin MPO aktivitesini baskılayabildiği ve bu sayede oksidatif yükü azaltabildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Lin vd., 2024). Bu durum, çalışmamızda gözlenen TOS azalması ile birlikte değerlendirildiğinde, ekstraktların oksidatif stres azaltıcı etkisinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Enzimlerin in vitro ve in vivo ortamda davranışları farklı olabilir. Bu çalışma ile sadece çevresel etkiler örneğin HDL bağımlı PON aktivitesi yanında enzim dinamikleri de gösterilmeye çalışılmıştır. Sonuçların klinik olarak doz bağımlı antioksidan aktivitelerin in vitro etkilerinin in vivo çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez Çalışması karadut meyvelerinden elde edilen sulu ve etanolik ekstraktların in vitro ortamda serumda klinik açısından öneme sahip antioksidan etki gösteren Paraoksonaz (PON) enzimi ile yine bu enzimin arilesteraz (ARE) aktivitesi, Katalaz enzim aktivitesi ve Miyeloperoksidaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla hazırlanan sulu ve etanolik ekstraktlar serum havuzu ile karıştırılarak belli konsantrasyonlarda deney numuneleri oluşturuldu. Deneyin yorumlanabilmesi açısından karadut ekstraktları önce antioksidan kapasiteleri ve içeriklerinin belirlenmesine yönelik testlere tabi turuldu.

- 1- Antioksidan analizlerde Toplam fenolik madde (TPC) ve toplam flavonoid madde (TFC) açısından etanolik ekstraktlar sulu ekstraktlara göre daha yüksek değerlere sahipti
- 2- DPPH, FRAP, ABTS ve TAC analizlerinde yine ekstraktlar sulu ekstraktlara göre daha yüksek değerler gösterdi. TAS analizinde sulu ekstraktlar + serum örnekleri etanolik ekstraktlar + serum örneklerinden daha yüksek değere sahip olmakla beraber her iki grup da kontrol serumundan yüksekti. TAS analizinde ekstrakt konsantrasyonu arttıkça antioksidan kapasite de artmaktaydı. TOS değerleri ekstraktların tümünde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü.
- 3- PON1 aktivitesi sulu ekstraktlarda düşme eğilimde iken etanolik ekstraktların düşük dozlarında hafif artış görterdi, ARE aktivitesi ise hem sulu hem de etanolik ekstraktlarda dozla azalma eğiliminde idi.
- 4- Katalaz aktivitesi kontrol serumuna göre her iki ekstrakt grubunda belirgin biçimde artmıştı. Bununla beraber her iki ekstrakt grubu birbirlerine paralel dalgalanma göstermekte idi. MPO aktivitesi ise genel olarak etanolik grupta daha stabil ve kontrole yakinken en düşük ve en yüksek ekstraktlarda tavan değerlere sahipti.
- 5- Sulu ve etanolik ekstraktların HPLC analizlerinde toplam 7 fenolik bileşik tespit edildi. Protokatekuit asit ve kateşin en fazla bulunan bileşiklerdi.
- 6- Bu çalışmada elde edilen in vitro veriler in vivo çalışmalarda aynı enzimlerin davranışlarını açıklarken kimyasal etmenlerin, ekstraktlardaki fenolik bileşiklerin enzim aktivitelere nasıl etki edebileceği konusunda açıklamaya yardımcı olabilir.

## KAYNAKÇA

- Acıbuca, V. ve Budak, D.B. (2018). Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33 (1), 37-44. <https://hdl.handle.net/20.500.12514/999>
- Ahmed, D., Khan, M. M. ve Saeed, R. (2015). Comparative analysis of phenolic, flavonoids, and antioxidant and antibacterial potential of methanolic, hexanic and aqueous extracts from adiantum caudatum leaves. *Antioxidants*, 4(2), 394-409. doi: 10.3390/antiox4020394.
- Grzegorzewska, A. E., Ostromecka, K., Adamska, P., Mostowska, A., Warchoń, W. ve Jagodziński, P. P. (2020). Paraoxonase 1 gene polymorphisms concerning non-insulin-dependent diabetes mellitus nephropathy in hemodialysis patients. *Journal of diabetes and its complications*, 34(11), 107687. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107687>
- Altındağ, Ö. Karakoç, M., Soran, N., Çelik, H., Çelik, N. ve Selek, Ş. (2007). Paraoxonase and Arylesterase Activities in Patients with Rheumatoid Arthritis, *Rheumatism* 22, 132-6. doi: 10.1007/s10067-006-0300-8
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L., ve La Du, B. N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* 101, 1581–1590. doi: 10.1172/JCI1649
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M,...La Du, B. (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraox-onase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10), 1617–162. doi: 10.1161/01.atv.18.10.1617
- Baltacı, C., Erkmen B.D., Altıntaş, R., Dalkıran, Y., Akdoğan, A. ve Okan, O. T. (2024). Physicochemical Properties, Antioxidant Capacity and Sensory Acceptability of Instant Rosehip Teas Prepared by Spray-Drying and Freeze-Drying Methods. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 74(3), 244–254. <https://doi.org/10.31883/pjfns/191929>.
- Bhattacharyya, T., Nicholls, S. J., Topol, E. J., Zhang, R., Yang, X., Schmitt, D,...Hazen, S. L. (2008). Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene

- polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA*, 299(11), 1265–1276.  
<https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1265>
- Benzie, I. ve Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. doi: 10.5603/AHP.2021.0009
- Bounafaa, A., Berrougui, H., Ikhlef, S., Essamadi, A., Nasser, B., Bennis, A...Khalil, A. (2014). Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients. *Clinical Biochemistry*, 47(18), 318–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.001>.
- Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D. ve Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology*, 78(3), 206–209. doi: 10.1111/1523-1747.ep12506462
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K,... Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov.*, 11(1),19. doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8
- Cherki, M., Berrougui, H., Isabelle, M., Cloutier, M., Koumbadinga, G. A., ve Khalil, A. (2007). Effect of PON1 polymorphism on HDL antioxidant potential is blunted with aging. *Experimental gerontology*, 42(8), 815–824. Doi.10.1016/j.exger.2007.04.006
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N. ve Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19–27. doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.010.
- Darak, M., Kılınc, K., Akar, Z., Özad Düzgün, A., Acet, T., Ural, M.N,...Akmeşe, O. (2024). Effect of Different Storage Conditions and Infusion Times on Antioxidant and Antimicrobial Activities and Total Phenolic Content of Rosehip Fruits. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 9(4), 711-720. doi.org/10.35229/jaes.1567422
- Demir, S., Turan, I., Aliyazicioglu, Y., Kilinc, K., Yaman, S. O., Ayazoglu Demir, E,...Deger, O. (2017). Morus Rubra Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Through Endoplasmic Reticulum Stress and Telomerase. *Nutrition and cancer*, 69(1), 74–83.  
[doi.org/10.1080/01635581.2017.1247887](https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1247887)

- Divya, S.V. ve Bassam, R.A. (2021). Pathological Crosstalk Between Oxidized LDL and ER Stress in Human Diseases: A Comprehensive Review. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1-15. DOI: 10.3389/fcell.2021.674103
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. ve Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296–302. doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001
- Dzah, C.S., Zhang, H., Gobe, V., Danyinah. D.A. ve Duan. Y. (2024). Anti- and pro-oxidant properties of polyphenols and their role in modulating glutathione synthesis, activity and cellular redox potential: Potential synergies for disease management, *Advances in Redox Research.*, 11-100099. doi.org/10.1016/j.arres.2024.100099
- Ekmekçi. Ö., Donma, O., ve Ekmekçi. H. (2004). Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(2), 78-82. doi: 10.1385/bter:111:1:41
- Ercişli, S. ve Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 116(1), 41-46. doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.021
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277–285. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015
- Goswami, B., Tayal, D., Gupta, N., ve Mallika, V. (2009). Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 410(1-2), 1–12. doi: 10.1016/j.cca.2009.09.025.
- Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3) 143-151. DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-m
- Göktaş, Ö. ve Gıdık, B. (2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 145-151. doi: 10.5336/jtracom.2022-92244
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2
- Halliwell, B. ve Gutteridge J.M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press. doi: 10.1007/0-387-26741-7\_3

- Huo, J., Ni, Y., Li, D., Qiao, J., Huang, D., Sui, X. ve Zhang, Y. (2023). Comprehensive structural analysis of polyphenols and their enzymatic inhibition activities and antioxidant capacity of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Food chemistry*, 427, 136605. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136605
- Jakubowski, H. (2024). The Molecular Bases of Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Properties of Paraoxonase 1. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 13(11), 1292. <https://doi.org/10.3390/antiox13111292>
- Jaouad, L., de Guise, C., Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M., Fulop, T...Khalil, A. (2006). Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, 185(1), 191–200. doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.012.2005.06.012
- Jyoti, K., Seema, M., Gursharan, S., Arun R., Shailendra, K. A. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16, 192-199. doi 10.1016/j.bcab.2018.07.035
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş. (2016). Serbest radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 4(1): 50-59. doi: 10.5505/yeditepe.2021.19870
- Khalifa, I., Zhu, W., Li, K.K., Li, C. (2018). Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability—A structural review, *Journal of Functional Foods*, 40, 28-43. doi: 10.3390/foods11081170
- Klebanoff S.J. (2005). Myeloperoxidase: Friend and foe. *J Leukoc Biol.* 77(5), 598–625. doi: 10.1189/jlb.1204697.
- Kilinc, K., Aygül, İ., Akmeşe, O., Baltacı, C., Hafedh, M.A. (2025). Evaluation of antioxidant, antimicrobial, and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition properties of *Rosa canina* seed extracts prepared with different solvents using maceration and ultrasound-assisted extraction methods, *Turk J Anal Chem*, 7(2), 85–96. doi: 10.51435/turkjac.1643744
- Koç, S. T., Akyüz, A., ve Şirin, D.Y. (2025). Role of aronia melanocarpa phenolic compounds in pon1-centered lipid metabolism and antioxidant defense: an integrated approach utilizing admet and molecular docking. *Yuzuncu Yil University Journal of the Institute of Natural and Applied Sciences*, 30(3), 974-989. doi: 10.53433/yyufbed.1753059
- Krishnamurthy, H.K., Pereira, M., Rajavelu, I., Jayaraman., Krishna, K., Wang, T.,...Rajasekaran, J.J. (2024). Oxidative stress: fundamentals and advances in

- quantification techniques. *Front. Chem.* 12, 1470458. doi: 10.3389/fchem.2024.1470458
- Lambert, J. D ve Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), 65–72
- Lewoń-Mrozek, D., Kurzynoga, J., Jędrzejewski, P., Kędzierska, K., Partyka, A.,... Ściskalska, M. (2024). Molecular Structure of Paraoxonase-1 and Its Modifications in Relation to Enzyme Activity and Biological Functions—A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 13129. doi.org/10.3390/ijms252313129
- Lim, S. H. ve Choi, C. I. (2019). Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*, 11(2), 437. doi: 10.3390/nu11020437
- Lin, W., Chen, H., Chen, X. ve Guo, C. (2024). The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(1), 132. https://doi.org/10.3390/antiox13010132
- Lotito, S. B., Actis-Goretta, L., Renart, M. L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H. H., ...Fraga, C. G. (2000). Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(3), 945–951. doi.org/10.1006/bbrc.2000.3571
- Loued, S., Isabelle, M., Berrougui, H. ve Khalil, A. (2012). The anti-inflammatory effect of paraoxonase 1 against oxidized lipids depends on its association with high density lipoproteins. *Life Sci.* 90(1–2), 82–88. doi: 10.1016/j.lfs.2011.10.018.
- Lusis A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801),233–241. doi: 10.1038/35025203.
- Memişoğulları, R ve Orhan, N. (2010) Paraoksonaz ve Kanser. *Konuralp Tıp Dergisi.* 2(2);22-26. doi: 10.35440/hutfd.579011
- Meneses, M. J., Silvestre, R., Sousa-Lima, I. ve Macedo, M. P. (2019). Paraoxonase-1 as a Regulator of Glucose and Lipid Homeostasis: Impact on the Onset and Progression of Metabolic Disorders. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 4049. doi.org/10.3390/ijms20164049
- Mohammed, C. J., Lamichhane, S., Connolly, J. A., Soehnlen, S. M., Khalaf, F. K., Malhotra, D.,... Kennedy, D. J. (2022). A PON for All Seasons: Comparing Paraoxonase Enzyme Substrates, Activity and Action including the Role of PON3 in Health and Disease. *Antioxidants*, 11(3), 590. doi.org/10.3390/antiox11030590

- Mohd, Nor, N.S., Al-Khateeb, A.M., Chua, Y.A., Mohd, Kasim, N.A., Mohd, Nawawi, H. (2019). Hypercholestérolémie familiale hétérozygote chez une paire de jumeaux identiques : rapport de cas et revue de la littérature. *BMC Pediatr*, 19 (1) Doi: 106. doi: 10.5543/tkda.2020.62185
- Nicholls, S. J. ve Hazen, S. L. (2009). Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of lipid research*, 50 Suppl(Suppl), S346–S351. doi.org/10.1194/jlr.R800086-JLR200
- O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, (54), 4 ,287-293, doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Otocka-Kmieciak A. (2022). Effect of Carotenoids on Paraoxonase-1 Activity and Gene Expression. *Nutrients*, 14(14), 2842. <https://doi.org/10.3390/nu14142842>
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3): 331-336. doi.org/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545
- Paje, L. A., Choi, J., Lee, H. D., Kim, J., Yu, A. R., Bae, M. J.,... Lee, S. (2022). Phenolic acids and flavonoids from *Salvia plebeia* and HPLC-UV profiling of four *Salvia* species. *Heliyon*, 8(3), e09046. Doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09046.
- Pahwa R, Goyal, A. ve Jialal, I. Chronic Inflammation.(2023). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., siaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Gani, I. ve Sauro-Calixto, F. (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int.*, 41, 274–85. doi.org/10.1016/j.foodres
- Perron, N. R., Wang, H. C., DeGuire, S. N., Jenkins, M., Lawson, M. ve Brumaghim, J. L. 2010. Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding, *Dalton Transactions*, 39, 9982- 9987 doi: 10.1039/c0dt00752h
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340(2), 115–126. doi:10.1056/NEJM199901143400207. PMID:9887164.Rozek,
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Reesb, J.F. ve Larondellea, Y., (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species

- from the Amazonian region, *Food Chem.*, 101 (3), pp. 1012–1018. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055
- Sirca, T. B., Mureşan, M. E., Pallag, A., Marian, E., Jurca, T., Vicaş, L. G...Ştefan, L. (2024). The Role of Polyphenols in Modulating PON1 Activity Regarding Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*, 25(5), 2962. <https://doi.org/10.3390/ijms25052962>
- Soran, H., Schofield, J.D. ve Durrington, P.N. (2015). Antioxidant properties of HDL. *Front. Pharmacol.* 6:222. doi: 10.3389/fphar.2015.00222.
- Sun, M., Deng, Y., Cao, X., Xiao, L., Ding, Q., Luo, F...Zhao, H. (2022). Effects of natural polyphenols on skin and hair health: a review. *Molecules*, 27(22), 7832. doi: 10.3390/molecules27227832
- Sviridov, D., Mukhamedova, N., Remaley, A.T., Chin-Dusting, J. ve Nestel, P. (2008). Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J. Atheroscler. Thromb.* 15(2), 52–62. doi: 10.5551/jat.e571
- Taler-Verčič, A., Goličnik, M. ve Bavec, A. (2020). The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5980. doi: 10.1080/14756366.2019.1695792.
- Thyagaraju, B. M. ve Muralidhara (2008). Ferulic acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat. *Zoological science*, 25(8), 854–860. doi.org/10.2108/zsj.25.854
- Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N. A., Yaman, S. O., Akbulut, K...Deger, O. (2017). Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(2), 241–248. doi: 10.1016/j.jsps.2016.06.002
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van der Veen, B. S., de Winther, M. P., Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants ve redox signaling*, 11(11), 2899–2937. doi: 10.1089/ars.2009.2538
- Vijayan, K., Chauhan, S., Das, N.K., Chakraborti, S.P., B.N. Roy. (1997). Leaf yield component combining abilities in mulberry (*Morus* spp.) *Euphytica*, 98 (1–2); pp. 47–52. doi: 10.3390/genes15101277

Zhang, R., Brennan, M. L., Fu, X., Aviles, R. J., Pearce, G. L., Penn, M. S.,...Hazen, S. L. (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 286(17),2136-2142.

<https://doi.org/10.1001/jama.286.17.2136>

Zhang, R., Zhang, Q., Zhu, S., Liu, B., Liu, F., ve Xu, Y. (2022). Mulberry leaf (*Morus alba* L.): A review of its potential influences in mechanisms of action on metabolic diseases. *Pharmacological research*, 175, 106029.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106029>

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
Trabzon Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 10496660-191

29.04.2025

Konu : Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Kararları

Toplantı Tarihi : 29.04.2025

Toplantı Saati : 15.00

Toplantı No : 2025/03

Gümüşhane Üniversitesi MDBF Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILIÇ'ın sorumlu, Dr. Öğr. Üyesi Nuri GÜLEŞÇİ, MSc. Abdoulaye COULIBALY'nin yardımcı araştırmacı olduğu 2025/191 kayıt numaralı, "Karadut (*Morus nigra L.*) Ekstratlarının Antioksidan Aktiviteleri ve Serum Paraoksonaz I, Arilesteraz, Katalaz ve Myelopreoksidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli araştırma önerisi; gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, çalışmanın yapılacağı ilgili Ana Bilim Dalı'ndan ve Başhekimlik ve/veya İl Sağlık Müdürlüğü'nden izin alındıktan sonra çalışmanın yürütülmesi etik açıdan uygun bulunmuştur.

S.N	ADI SOYADI	BÖLÜM	ABD	GÖREV YAPTIĞI BİRİM	İMZA
1	Doç. Dr. Fatma HANCI	Dahili	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Başkan	
2	Doç. Dr. Nurdan Gamze TAŞLI	Cerrahi	Göz Hastalıkları	Başkan Yrd.	
3	Prof. Dr. Ali Rıza AKYÜZ	Dahili	Kardiyoloji	Üye	
4	Doç. Dr. İbrahim Selçuk ESİN	Dahili	Çocuk Ergen Ruh Sağlığı	Üye	
5	Doç. Dr. Gamze KÜÇÜKOSMAN	Cerrahi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Üye	
6	Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz SEZGİN	Dahili	Aile Hekimliği	Üye	
7	Dr. Öğr. Üyesi Kübra BAKI ERİN	Cerrahi	Kadın Hast. ve Doğum	Üye	
8	Dr. Öğr. Üyesi Ufuk SAYAR	Cerrahi	Kalp ve Damar Cerrahisi	Üye	
9	Dr. Öğr. Üyesi Özlem BAYRAKTAR SARAL	Cerrahi	Enfeksiyon Hast. ve Klinik Mikrobiyoloji	Üye	
10	Dr. Öğr. Üyesi Halil Afşin TAŞDELEN	Cerrahi	Genel Cerrahi	Üye	
11	Dr. Öğr. Üyesi Özgen GÖNENÇ ÇEKİÇ	Dahili	Acil Tıp	Üye	
12	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif RAMAZANOĞLU	Cerrahi	Üroloji	Üye	
13	Dr. Öğr. Üyesi Ayten LİVAOĞLU	Cerrahi	Tıbbi Patoloji	Üye	

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Trabzon Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu  
Kurum Eğitim ve Araştırma Hastanesi Numune Kampüsü İnönü Mahallesi Kahramanmaraş Caddesi Ortahisar/Trabzon  
Tel: 90 462 333 00 30-31 Fax: 90 462 333 00 32 e-mail: trabzon.baek@sbu.edu.tr

## ÖZGEÇMİŞ

2015 yılında Lycée de Garçon de Bingerville, Côte d'Ivoire'de lise diplomasını aldı. 2020 yılında Bamako / Mali'de sağlık bilimleri (Tıbbi Biyoloji) alanında lisans derecesi ile mezun oldu. 2018 ile 2020 yılları arasında Bamako'daki bazı liselerde öğrenciler arasında cinsel yolla bulaşan hastalıklar üzerine; ikincisi ise kırsal bölgelerde kan bağışının önemi üzerine yürütülen iki farkındalık ve eğitim projesinde yer almıştır. Bunlardan ilki,. Bu projeler sırasıyla ARCAD/SIDA ile Bamako'da ve Hôpital Sominé Dolo de Mopti ile gönüllü kan bağışçıları iş birliği içinde (Croix-Rouge gözetiminde) gerçekleştirilmiştir. Bamako'da bulunan Institut National de Santé Publique (INSP)'te ve ayrıca başta Hôpital Sominé Dolo de Mopti'nin laboratuvarı olmak üzere çeşitli laboratuvarlarda ileri düzey stajlar yapmıştır. Hitabet sanatı, liderlik, iletişim ve proje yönetimi gibi bazı beceriler geliştirmiş olup, toplum sağlığı projeleri geliştirme, biyoloji alanında eğitim verme ve farkındalık oluşturma konusunda yetkindir.

Teknik ve bilimsel gelişmeler ve özellikle öğrencilere sunulan teknik imkanlar sebebi ile eğitimime Türkiye'de devam etme aldı. etkiledi. 2002 yılında Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji ABD'da yüksek lisans programına başladı Yüksek lisans diplomamı aldıktan sonra, ülkesi Fildişi Sahili ve Afrika'nın sağlık alanındaki gelişimine katkıda bulunmak için biyoloji alanındaki bilgisini artırmak amacıyla eğitimine devam etmeyi hedeflemektedir.

Hitabet sanatı, liderlik, iletişim ve proje yönetimi gibi bazı beceriler geliştirmiş olup, toplum sağlığı projeleri geliştirme, biyoloji alanında eğitim verme ve farkındalık oluşturma konusunda yetkindir.