

ARONIA MELANOCARPA
(MICHX.) ELLIOT TÜRÜ ÜZERİNE
FARMAKOGNOZİK İNCELEMELER

Doktora Tezi
Uzm. Ecz. Eda SÖNMEZ GÜRER
Eskişehir 2022

**ARONIA MELANOCARPA (MICHX.) ELLIOT TÜRÜ ÜZERİNE
FARMAKOGNOZİK İNCELEMELER**

Uzm. Ecz. Eda SÖNMEZ GÜRER

DOKTORA TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kasım 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Eda SÖNMEZ GÜRER'in "*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot Türü Üzerine Farmakognozik İncelemeler" başlıklı tezi 28.11.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognози Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)		:Prof.Dr. Ayhan ALTINTAŞ
.....		
Üye		:Prof.Dr. Gökarp İŞCAN
.....		
Üye		:Prof.Dr. Yavuz Bülent KÖSE
.....		
Üye		:Prof.Dr. Hüsniye KAYALAR
.....		
Üye		:Doç.Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN
.....		

	Prof.Dr. Gülşen AKALIN
ÇİFTÇİ	
	Enstitü Müdürü

ÖZET

ARONIA MELANOCARPA (MICHX.) ELLIOT TÜRÜ ÜZERİNE FARMAKOGNOZİK İNCELEMELER

Uzm. Ecz. Eda SÖNMEZ GÜRER

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kasım 2022

Danışman: Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Bu tez çalışması kapsamında Kırklareli bölgesinde kültür olarak yetiştirilmekte olan *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot bitkisinden toplanan meyvelerden metanol, %70 etanol, etanol, etil asetat, hekzan ve su ekstraları hazırlanmıştır. Elde edilen ekstraların verim hesapları yapılmış, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kimyasal içerikleri aydınlatılmış, toplam fenolik, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin madde miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Ekstraların antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH[•], ABTS^{•+}, Metal şelatlama, CUPRAC ve Lipid peroksidasyon yöntemleri kullanılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri için MİK değerleri bakteri ve maya mikroorganizmalarında belirlenmiştir. Antikanser aktivite tayini için meme kanseri (MCF-7) ve serviks kanseri (HeLa) hücre hatları üzerinde, sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki tayininde ise insan endotelial (HUVEC) ve fare fibroblast (L929) hücre hatları üzerinde MTT yöntemi kullanılmış ve ekstralar etkinlik açısından karşılaştırılmıştır. Ekstraların DNA hasarını önleyici etkileri pBR322 plazmit DNA'sı üzerinde incelenmiş ve sonuçlar kıyaslamalı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Aronia melanocarpa*; Antioksidan; Antikanser; Sitotoksikite;

ABSTRACT

PHARMACOGNOSIC STUDIES ON *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOT SPECIES

Exp. Pharmacist. Eda SONMEZ GURER

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Institute of Health Sciences, November 2022

Supervisor: Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Within the scope of this thesis, methanol, 70% ethanol, ethanol, ethyl acetate, hexane and water extracts were prepared from the fruits collected from the *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot plant, which is cultivated in the Kırklareli region. Yield calculations of the extracted extracts were made, chemical contents were clarified with high performance liquid chromatography, total phenolic, total flavonoid and total anthocyanin substance amounts were measured spectrophotometrically and the results were evaluated. DPPH[•], ABTS^{•+}, Metal chelation, CUPRAC and Lipid peroxidation methods were used to determine the antioxidant activities of the extracts and the results were evaluated. The MIC values for their antimicrobial activities were determined as bacteria and yeast microorganisms. For the determination of anticancer activity on breast cancer (MCF-7) and cervical cancer (HeLa) cell lines, for the determination of cytotoxic effects on healthy cells, human endothelial (HUVEC) and mouse fibroblast (L929) cell lines The MTT method was used and the extracts were compared in terms of effectiveness. The DNA damage inhibitory effects of the extracts were examined on pBR322 plasmid DNA and the results were evaluated comparatively.

Keywords: *Aronia melanocarpa*; Antioxidant; Anticancer; Cytotoxicity;

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans, doktora tez çalışmam ve tüm akademik hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen, her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ'a

Akademik bilgileri ile lisans yıllarımdan itibaren bana yol gösteren ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Gökalg İŞCAN ve sayın Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE'ye,

Uzarlarda da olsa bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR'a,

Aktivite çalışmalarında bana laboratuvarlarının kapısını açan, büyük sabır ve özveri ile kıymetli vaktini ayıran sevgili hocam sayın Doç. Dr. Sevgi DURNA DAŞTAN'a,

Kromatografi çalışmalarımda bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Esra KARADAĞ'a,

Bu günlere gelmemde desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, beni her konuda cesaretlendiren sevgili eşim Uğur, güzel kızlarım Duru ve Ada'ya,

Ve manevi olarak desteğini en derinden hissettiğim, yaşasaydı benimle gurur duyacak olan canım annem, melek annem Hatice SÖNMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Eda SÖNMEZ GÜRER

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Aronia melanocarpa</i> ve Botanik Özellikleri	3
2.2. <i>Aronia</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	6
2.2.1. Fitokimyasal bileşenler	6
2.2.2. Kullanılışları ve biyolojik aktivite çalışmaları.....	9
2.2.2.1. <i>Aronia melanocarpa</i> etnobotanik kullanımları	9
2.2.2.2. <i>Aronia melanocarpa</i> üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Çalışmanın bitki materyali	14
3.1.2. Çalışmanın sarf malzemeleri	14
3.1.3. Cihazlar ve laboratuvar ekipmanları	15
3.1.4. Kullanılan reaktifler.....	16
3.2. Yöntemler.....	16
3.2.1. Bitkisel Materyal	16
3.2.2. Ekstraksiyon	16

3.2.3. Analitik çalışmalar	18
3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	18
3.2.3.2. Toplam fenolik madde miktar tayini.....	19
3.2.3.3. Toplam flavonoit miktar tayini.....	20
3.2.3.4. Toplam antosiyanin miktar tayini	21
3.2.4. Biyolojik aktivite çalışmaları.....	22
3.2.4.1. Antioksidan aktivite tayinleri	22
3.2.4.1.1. DPPH [•] (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini giderme aktivitesi	22
3.2.4.1.2. ABTS ^{•+} (TEAC-Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi)	23
3.2.4.1.3. Metal şelatlama aktivitesi	24
3.2.4.1.4. CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite)	24
3.2.4.1.5. HUVEC ve L929 hücre kültürlerinde lipid peroksidasyonu tayini	25
3.2.4.2. Antimikrobiyal aktivite	26
3.2.4.2.1. Mikrobiyal süşlar	26
3.2.4.3. In vitro antitümör aktivite belirlenmesi	27
3.2.4.4. In vitro sitotoksik aktivite belirlenmesi	29
3.2.4.5. DNA hasarını önleyici aktivite	30
3.2.4.5.1. Elektroforez metodu.....	32
3.2.4.5.2. DNA koruyucu aktivitenin tespiti.....	32
3.2.4.5.3. Agaroz jelin hazırlanması ve görüntülenmesi.....	33
3.2.4.6. İstatistiksel değerlendirme.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Ekstraksiyon	36
4.2. Analitik çalışmalar	36
4.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sonuçları	36
4.2.1.1. Fenolik bileşiklerin HPLC analizi sonuçları.....	36
4.2.1.2. Antosiyanin bileşiklerinin HPLC analizi sonuçları	39
4.2.2. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları	40
4.2.3. Toplam flavonoit miktar tayini sonuçları	41
4.2.4. Toplam antosiyanin miktar tayini sonuçları.....	42
4.3. Biyolojik Aktivite Sonuçları.....	43
4.3.1. Antioksidan aktivite sonuçları	43
4.3.1.1. DPPH [•] yöntemi aktivite sonuçları	43
4.3.1.2. ABTS ^{•+} yöntemi aktivite sonuçları.....	44

4.3.1.3. <i>Metal şelatlama yöntemi aktivite sonuçları</i>	46
4.3.1.4. <i>CUPRAC yöntemi aktivite sonuçları</i>	48
4.3.1.5. <i>Lipid peroksidasyon yöntemi aktivite sonuçları</i>	50
4.3.2. Antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	50
4.3.3. <i>In vitro</i> antitümör aktivite sonuçları.....	51
4.3.4. <i>In vitro</i> sitotoksik aktivite sonuçları.....	55
4.3.5. DNA hasarını önleyici aktivite sonuçları.....	59
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
KAYNAKÇA.....	69
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Ülkemizde <i>Aronia</i> üretimi yapılan iller ve 2021 yılı fidan sayıları (https://www.tarimorman.gov.tr)	5
Tablo 4.1. <i>Aronia melanocarpa</i> meyvelerinin farklı çözücülerle hazırlanmış ekstre verimleri	36
Tablo 4.2. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının fenolik bileşikleri (R.T.: Retention time)	39
Tablo 4.3. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g ekstre)	40
Tablo 4.4. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının toplam flavonoit madde miktarı (mg QE/g ekstre)	41
Tablo 4.5. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının toplam antosiyanin madde miktarı (mg Cyn-3-glu/g ekstre)	42
Tablo 4.6. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının serbest radikal üzerinden hesaplanan inhibe değerleri	43
Tablo 4.7. Standart antioksidanlar ve bitki ekstraları için ABTS ^{•+} radikali süpürme aktivite değerleri (Bitki Numunesinin veya standartın doğru denkleminin eğimi/Troloks grafiğinin doğru denkleminin eğimi)	45
Tablo 4.8. Çalışmada kullanılan standart ve bitki ekstralarının metal şelatlama aktiviteleri	48
Tablo 4.9. Standart antioksidanlar ve bitki ekstraları için TEAC _{CUPRAC} değerleri	49
Tablo 4.10. HUVEC ve L929 hücre hatlarında 100 µg/mL konsantrasyonda <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının uygulandığında MDA seviyeleri	50
Tablo 4.11. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının antimikrobiyal aktivite sonuçları	51
Tablo 4.12. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının MCF-7 ve HeLa hücre hatlarındaki IC ₅₀ seviyeleri	52
Tablo 4.13. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının HUVEC ve L929 hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerleri (p>0,05)	56
Tablo 4.14. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının HUVEC, MCF-7 ve HeLa hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılmasından elde edilen Seçicilik İndeksi (Selectivity Index)	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bitkilerdeki altı temel antosiyanidin (siyanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, petunidin) (Khoo vd., 2017).....	7
Şekil 2.2. <i>Aronia melanocarpa</i> türünün kimyasal bileşiminde bulunan 4 farklı siyanidin glikozit karışımı ve epikateşin (Kulling ve Rawel, 2008).....	8
Şekil 3.1. Gallik asit standart grafiği	20
Şekil 3.2. Kersetin (quercetin) standart grafiği.....	21
Şekil 3.3. Troloksun kalibrasyon eğrisi ($R^2 = 0,9957$)	25
Şekil 3.4. Plazmit DNA'sının farklı formları (Takım, 2010).	31
Şekil 4.1. Ferulik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 10.416)	37
Şekil 4.2. Kafeik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 5.408).....	37
Şekil 4.3. Kersetin HPLC kromatogramı (R.T.: 17.419).....	37
Şekil 4.4. Kersetin-3-galaktozit HPLC kromatogramı (R.T.: 4.620)	37
Şekil 4.5. p-Kumarik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 8.809)	38
Şekil 4.6. Metanol ekstresi HPLC kromatogramı (p-kumarik asit R.T.: 8.594; Ferulik asit R.T.: 10.349).....	38
Şekil 4.7. %70'lik etanol ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.576; kafeik asit R.T.: 5.381)	38
Şekil 4.8. Etanol ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.644; kafeik asit R.T.: 5.371).....	38
Şekil 4.9. Etil asetat ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.644; kafeik asit R.T.: 5.371; p-kumarik asit R.T.:8.509; kersetin R.T.:17.862)	39
Şekil 4.10. Antosiyanin standart karışımı HPLC kromatogramı (malvin R.T.: 4.711; malvidin-3-o-glukozit R.T.:7.175) (R.T.: Retention time)	40
Şekil 4.11. Metanol ekstresi HPLC kromatogramı (malvin R.T.: 4.590) (R.T.: Retention time)	40
Şekil 4.12. Bitki ekstralarının gallik asite eşdeğer (mg GAE/g) toplam fenolik madde miktarı	41
Şekil 4.13. Bitki ekstralarının kersetine eşdeğer (mg/g) toplam flavonoit miktarları	42
Şekil 4.14. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının toplam antosiyanin madde miktarı (mg Cyn-3-glu/g ekstre)	43
Şekil 4.15. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının antioksidan kapasitelerinin DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri	44
Şekil 4.16. <i>Aronia</i> meyve ekstralarının troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri	46
Şekil 4.17. Troloks için standart eğri grafiği	47
Şekil 4.18. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının metal şelatlama kapasiteleri.....	48

Şekil 4.19. <i>Aronia</i> meyve ekstralarının TEAC _{CUPRAC} kapasiteleri	49
Şekil 4.20. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının MCF-7 hücre hattındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (**p<0.01)	53
Şekil 4.21. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının HeLa hücre hattındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (**p<0.01)	53
Şekil 4.22. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının HUVEC hücre hattındaki % hücre canlılık sonuçları	57
Şekil 4.23. <i>Aronia melanocarpa</i> meyve ekstralarının L929 hücre hattındaki % hücre canlılık sonuçları	57
Şekil 4.24. <i>Aronia</i> meyvesinin farklı ekstralarının plazmit DNA hasarı giderici etkisinin değerlendirilmesi	62

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. <i>Aronia melanocarpa</i> meyvesi.....	3
Görsel 2.2. Kırklareli bölgesindeki materyalin toplandığı <i>Aronia</i> yetiştirme alanından görüntüler	6
Görsel 3.1. Ekstraksiyon işlemi	17
Görsel 3.2. Rotavaporda çözücülerini uçurma işlemi	17
Görsel 3.3. HPLC cihazı için hazırlanan ekstre örnekleri.....	18
Görsel 3.4. HPLC cihazı için hazırlanan standart maddeler	19
Görsel 3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Agilent 1100 HPLC).....	19
Görsel 3.6. DPPH• analizi uygulamaları	23
Görsel 3.7. CO ₂ inkübatörü.....	28
Görsel 3.8. MTT reaksiyonu hazırlanmış 96 kuyucuklu plak.....	29
Görsel 3.9. MTT reaksiyonu hazırlanan platelerin absorban değerlerinin okunduğu Elisa plate okuyucu	29
Görsel 4.1. (A) MCF-7 hücre hattında MTT reaksiyonu plate görünümü, (B) HeLa hücre hattında MTT reaksiyonu plate görünümü, (C) MTT reaksiyonu sonuçlarının Elisa cihazı okumalar	52
Görsel 4.2. <i>Aronia</i> ekstraktlarının MCF-7 hücre hattında 300 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu	54
Görsel 4.3. <i>Aronia</i> ekstraktlarının HeLa hücre hattında 300 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu	55
Görsel 4.4. HUVEC ve L929 hücre hatlarında MTT reaksiyonu plate görünümü	56
Görsel 4.5. <i>Aronia</i> meyve ekstraktlarının HUVEC ve L929 hücre hattında 400 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu	58
Görsel 4.6. <i>Aronia</i> meyvesinin metanol, %70 etanol ve etanol ekstraktlarının DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	60
Görsel 4.7. <i>Aronia</i> meyvesinin etil asetat, hekzan ve su ekstraktlarının DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DPPH [•]	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
g	: Gram
kg	: Kilogram
GAE	: Gallik Asit Ekvivalanı
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
UV	: Ultraviyole Spektroskopisi
Nm	: Nanometre
α	: Alfa
ABTS ^{•+}	: 2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asit)
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
DMSO	: Dimetilsülfoksit
MIK	: Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
TEAC	: Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
FBS	: Fotal Bovine Serum
PBS	: Fosfat tamponu
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite
RT	: Alıkonma zamanı
MDA	: Malondialdehit
DAD	: Photodiode array dedector
TBA	: Tiyoarbitürik asit
TTC	: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anavatanı Kuzey Amerika ve Kanada'nın güneyi olan aronya (chokeberry), Rosaceae familyasına ait, yaprak döken, çalı formunda, üzüksü meyveler grubuna ait, uzun yıllar canlı kalan bir bitkidir. *Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot (Black chokeberrey), *Aronia prunifolia* (Marsh) (Purple chokeberry) ve *Aronia arbutifolia* (L.) Elliot (Red chokeberry) isminde üç ayrı türü bulunmaktadır (Kulling ve Rawel, 2008; Šnebergrová vd., 2014). Hemen her iklim şartına ve toprağa kolayca uyum sağlayan bir cins olan aronya, fenolik bileşiklerce zengin içeriği, yüksek antioksidan kapasitesine sahip olması, insan sağlığına ve beslenmesine faydaları sebebi ile 'süper meyve' ismi ile anılmaktadır (Kulling ve Rawel, 2008; Šnebergrová vd., 2014).

Üzümsü meyve olarak bilinen aronya sağlık potansiyeli olması sebebi ile dikkat çekmiş, 1900'lü yılların başlarında Rusya'ya getirilerek yetiştirilmeye başlanmış ve 1940'lı yıllardan itibaren üretimi hız kazanmıştır. 1950'li yıllardan sonra ise Doğu Avrupa ülkelerinde yetiştirilmeye ve ticaretine başlanmıştır (Šnebergrová vd., 2014).

Aronya meyveleri içeriğindeki zengin fitokimyasal bileşiklerden dolayı önemli derecede antioksidan aktivite göstermekte olup, kalp hastalıkları, kanseri önleme ve kronik hastalıklardan korunmada ve tedavi sürecinde etkin rol almaktadır (Oszmiański ve Lachowicz, 2016; Chrubasik vd., 2010; Graves, 2013; Tolic vd., 2015). Gıda ve sağlık sektöründe aktif şekilde kullanılmasına ilaveten farmakolojik aktivitelerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak adlandırılmakta, sağlık alanındaki bu popüleritesinden dolayı da dünya üzerindeki kullanımı ve kültürü gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Gıda sanayiinde şurup, meyve suyu, çay, sos, reçel gibi farklı şekillerde ve yoğun renginden dolayı besinlerin renklendirilmesi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Graves, 2013; Tolic vd., 2015). Fenolik bileşikler; kimyasal yapılarındaki hidroksil grupları ve aromatik halkalar ile bilinmektedirler. Fenolikler yapılarına göre; fenolik asitler, stilbenler, flavonoidler (flavonoller veya kateşinler, flavonoller, flavonlar, flavononlar, izoflavonoidler, antosiyaninler), tanen ve lignanlar olmak üzere 5 ana gruptan oluşmaktadırlar (Paredes-López vd., 2010).

Bitkisel kaynaklı önemli antioksidan bileşikler olarak karşımıza çıkan bu sekonder metabolit grupları, bitkilerin tıbbi amaçlı olarak kullanılmalarını sağlayan, insanların sağlıklı yaşam sürmeleri ve mevcut sağlık halinin devamlılığına katkı sağlayan esas fonksiyonel bileşik gruplarıdır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2009). Reaktif oksijen metabolitleri ya da serbest oksijen radikalleri tüm aerobik organizmalar

tarafından mitokondrilerin çalışması sonucunda ortaya çıkar ve nükleik asitler (DNA ve RNA), karbonhidratlar, lipitler, proteinler gibi makromoleküllere zarar verirler. Özellikle yaşlanmayla birlikte oksidatif hasarın birikiminin; DNA hasarı kaynaklı sağlık risklerinin, apoptosisin ve bazı ileri yaş hastalıklarının ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aslında hücreler serbest radikalleri detoksifiye eden antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Fakat antioksidan sistemler yaşla birlikte yetersiz kaldığı için oksidatif hasarlar birikerek, yaşlanmaya ve hastalıklara yol açar. Günümüzde 100' den fazla oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2009; Dizdaroğlu, 1992). Oksidatif stresle birlikte başlangıçta oluşan düşük düzeylerdeki DNA hasarı etkin bir şekilde onarılabilmektedir. Ancak, DNA onarım enzimleri ve polimeraz enziminin zamanla hasar görmesi, DNA'nın doğru bir şekilde kopyalanmasını ve ifadelenmesini azaltmaktadır. Oksidatif stresin yarattığı DNA hasarı yüksek düzeylere ulaştığında ise hücre ölümü gerçekleşmektedir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2009; Burçak ve Andican, 2004).

Yaban mersini, böğürtlen, mavi yemiş, aronya ve ahududu gibi üzüksü meyveler antioksidan aktivitesi yüksek olan gıda kaynaklarıdır (Benvenuti vd., 2004; Çağlar ve Demirci, 2017). Dünyadaki tüketim oranlarının son yıllarda artmakta olması, ihracat ve ithalatta bu meyvelerin değerini önemli ölçüde yükseltmektedir (Ağaoğlu, 2003).

Üzüksü meyveler sınıfında bulunan aronyanın içeriğindeki antioksidan etkideki fitokimyasal bileşiklerin yüksek olması sebebiyle diğer üzüksü meyvelerden daha fazla değerli olduğu belirlenmiştir. Aronyanın düzenli şekilde yenilmesi ile kalp damar sistemi hastalıkları, mide bağırsak sistemi hastalıkları ve çeşitli kanser hastalıklarında koruyucu rol oynadığı araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Kulling ve Rawel, 2008).

Tıbbi ve aromatik bitkiler, yenilebilir ve içilebilir kaynaklar olmaları sebebi ile insanlığa hizmet etmektedirler. Bitkilerin içeriklerinde doğal antioksidanlar, antimikrobiyal, antiviral ve antineoplastik vb. gibi etki gösteren çeşitli etken maddeler bulunmaktadır ve bu yüzden de pek çok farmakolojik aktivite çalışmalarının merkezinde yer almaktadırlar. Bitki içeriklerinde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler, flavonoidler, antosiyaninler gibi çeşitli fonksiyonel bileşiklerin taşıdıkları antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojen potansiyelleri ile kişilerde sağlık halinin sürdürülmesinde büyük yarar sağladıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Akalin ve Selamoğlu, 2019).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Aronia melanocarpa* ve Botanik Özellikleri

Aronia (chokeberry) meyvesi (Görsel 2.1.), Rosaceae familyasında bulunan, çok saplı, belli zamanlarda yaprak dökümü gerçekleşen, çalı tarzı, çok yıllık bir bitkidir. *Aronia*, çoğunlukla Kuzey Amerika’da doğal olarak yetişmekte, Doğu Avrupa bölgesinde de büyük oranda kültürü yapılmaktadır (Jeppsson, 2000; Kulling ve Rawel, 2008).



Görsel 2.1. *Aronia melanocarpa* meyvesi

Anayurdu Kuzey Amerika olarak bilinen ve üzümsü meyveler arasında olan aronya, hastalıklara karşı olumlu etkileri olması sebebiyle 1900’lerin ilk yıllarında Rusya’ya taşınarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Ticari anlamda üretimine 40’lı ve 50’li yıllarda önce Rusya’da sonrasında ise Doğu Avrupa’da başlanmakla beraber günümüzde Almanya’da da yaygın şekilde üretilmektedir (Kulling ve Rawel, 2008). *Aronia* üretimine öncelikle Eski Sovyetler Birliğinde, sonrasında 70’lerde Doğu Almanya ve Japonya’da, 80’li yıllarda ise Bulgaristan, Çekoslovakya, Polonya, Slovenya, Danimarka ve Finlandiya’da başlanmıştır (Walther ve Müller, 2012; Poyraz Engin ve Boz, 2019; Kokotkiewicz vd., 2010).

Bitkinin tür tanımı meyve rengine ve meyvenin olmadığı durumlarda ise; çeşitli organlardaki tüylülük durumuna bakılarak teşhis edilmektedir (Brand, 2010; Poyraz Engin ve Boz, 2019).

A. melanocarpa'yı diğer aronya türlerinden ayıran en belirgin özellikleri; bitki yüksekliğinin 1,2-2,4 m'ye kadar çıkabilmesi, sürgünlerinde koyu yeşil yapraklar bulunması, gövdesinde ve yaprak üzerlerinde tüylenmenin az miktarlarda veya hiç bulunmamasıdır. Sonbaharda yapraklar renk değiştirerek kıvılcımsı renklere dönmektedir. Yılın 5. ayında beyaz renkte çiçekler oluşmakta, 8. ay sonunda ise meyveler tam olgunluğa ulaşmaktadır. Meyveleri *Aronia arbutifolia*'nın meyvelerine oranla ebat olarak daha büyüktür. Yoğun yağmur alan kesimlerde meyveler bozulmaya uğramadan uzun zaman bitki üzerinde durabilmektedir (Brand, 2010; Berlin ve Zuzek, 2017).

Aronya meyveleri botanik anlamda yalancı meyve olarak tanımlanmaktadır. Meyvelerde beş karpel ve her karpelde bir tohum taslağı varlığı gözlenmiştir. Erken zamanlarda üzerinde yoğun şekilde tüylenme olan meyvelerde zamanla tüylenmenin yerini mumsu bir kaplamaya bıraktığı gözlenir. Çiçek burnunda stamen artıkları bulunmaktadır. İkinci dönemden beşinci döneme kadar meyveler çiçek burnundan itibaren renklenmeye başlamakta, yüzeyi önce pembe daha sonra pembeden mora, sonrasında mordan siyaha dönüşmekte ve son dönem olan altıncı dönemde ise olgun meyve dönemine geçilmesiyle beraber meyveler yeterli büyüklüğe ulaşarak siyah rengini almaktadır. Meyve siyah rengine ulaştıktan sonra da olgunlaşma süreci devam etmekte ve meyvelerin daha da büyüdüğü gözlemlenmektedir (Poyraz Engin vd., 2016).

En doğru verim için toprağın pH'sının 6 ile 6,5 arasında olması gerekmektedir. Dikiminden iki yıl sonra ağaçtan verim alınmaya başlanmakta ve beş yaşına ulaştığında en yüksek verim elde edilmektedir. Her ağaçtan ortalama 5 ile 17 kg arasında meyve alınmaktadır (Poyraz Engin vd., 2016).

Ülkemizde ilk aronya çalışmaları 2012 yılında Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde başlamış, bundan yaklaşık iki yıl sonra da Yalova ve Kırklareli'nde ufak bahçeler kurularak ticari anlamda yetiştiriciliğine başlanmıştır. Günümüzde Kırklareli, Bursa, İzmir, Bolu ve Tekirdağ'ın da aralarında bulunduğu birçok ilimizde üretimine devam edilmektedir (Tablo 2.1.). Üreticiler açısından maliyetlerin normalden az olması, uyum kabiliyeti, dış etkenlere ve mikroorganizmalara karşı dirençli olması, depolamaya, mekanik hasada müsaitliği ve nakliyeye dayanıklılığı

gibi pek çok sebep aronyayı cazip bir meyve türü haline getirmektedir (Yılmaz vd., 2021; Poyraz Engin vd., 2018; Poyraz Engin, 2020).

Tablo 2.1. Ülkemizde Aronia üretimi yapılan iller ve 2021 yılı fidan sayıları (<https://www.tarimorman.gov.tr>)

İller	Fidan Sayıları (adet)
Kırklareli	52.000
Bursa	23.500
Manisa	15.000
Kırşehir	8.000
Yalova	8.000
Çanakkale	7.000
Samsun	6.000
İzmir	5.000
Ordu	3.000
Antalya	3.000
İstanbul	3.000
Bolu	2.000
Ankara	2.000
Sakarya	1.500
Giresun	1.000
Çorum	500
Amasya	500
Tekirdağ	500
Trabzon	300
Toplam	129.800

İçeriğinde aronya bulunan ürünler üzerine yapılan çalışmalarda en yaygın olan ürün tipleri arasında; çaylar, yoğurtlar, nektarlar, meyve suları, jöleler, sakızlar, konsantre meyve suları ve çiğneme tabletleri bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (Engels ve Brinkman, 2014).



Görsel 2.2. *Kırklareli bölgesindeki materyalin toplandığı Aronia yetiştirme alanından görüntüler*

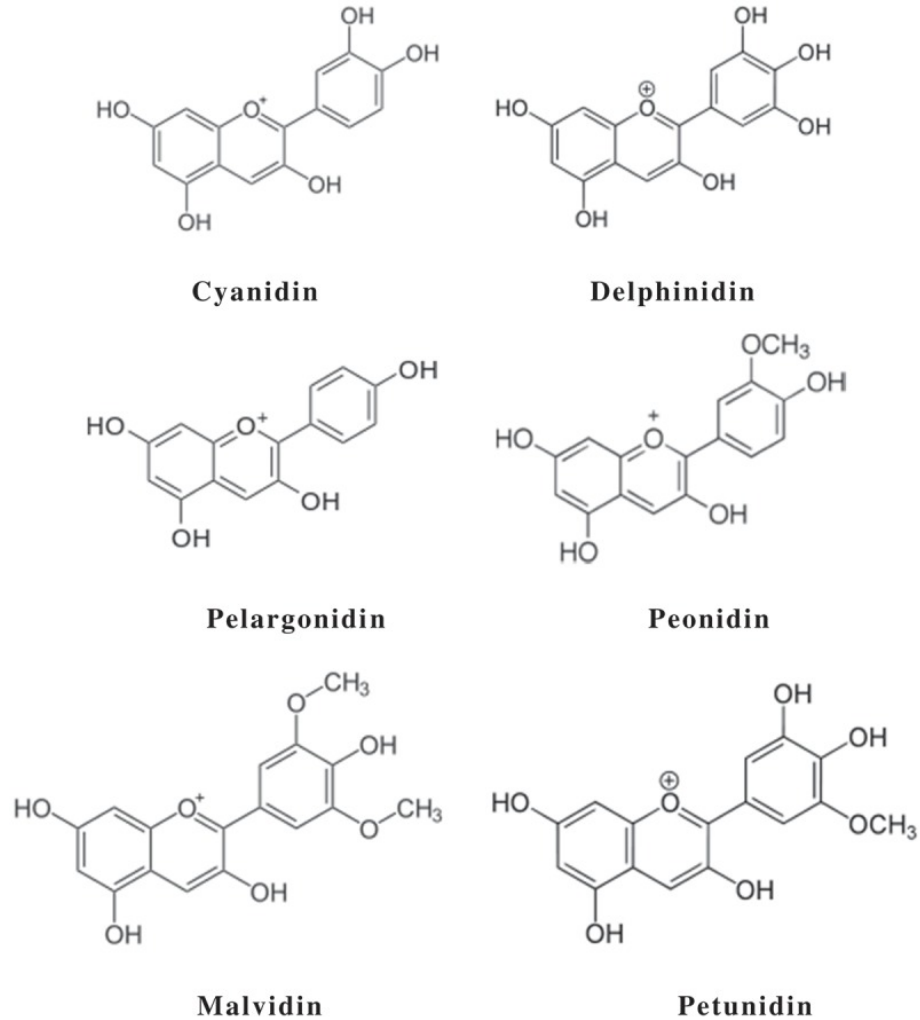
2.2. Aronia Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1. Fitokimyasal bileşenler

Polifenolik bileşikler eski zamanlardan bu yana potansiyel sağlık yararları sebebiyle eczacılık ve gıda sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Doğal gıdalarda bulunan birçok fenolik bileşik, yüksek antioksidan etkileri sebebiyle sağlık problemleri için olumlu çözümler sunabilmektedir (Özgen vd., 2016; Shahidi ve Ambigaipalan, 2015). Doğal olarak oluşan antioksidan bileşikler flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar, terpenler, tokoferoller, fosfolipitler ve organik asitler gibi kimyasal bileşiklerdir. Polifenolik bileşiklerden olan flavonoidler bitkinin hemen her organında bulunabilir (Selamoğlu, 2017; Afshar vd., 2011; Gazor vd., 2017). Günümüzde 6000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır. Flavonoid sekonder madde grubuna flavon, flavonol, izoflavon, flavanon, flavanonol, flavanol ve antosiyanidinler dahildir. Flavonoller esas olarak kersetin, kemferol ve mirisetin ile anılmaktadır, bunlardan kersetin en popüler olanıdır (Özgen vd., 2016; Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).

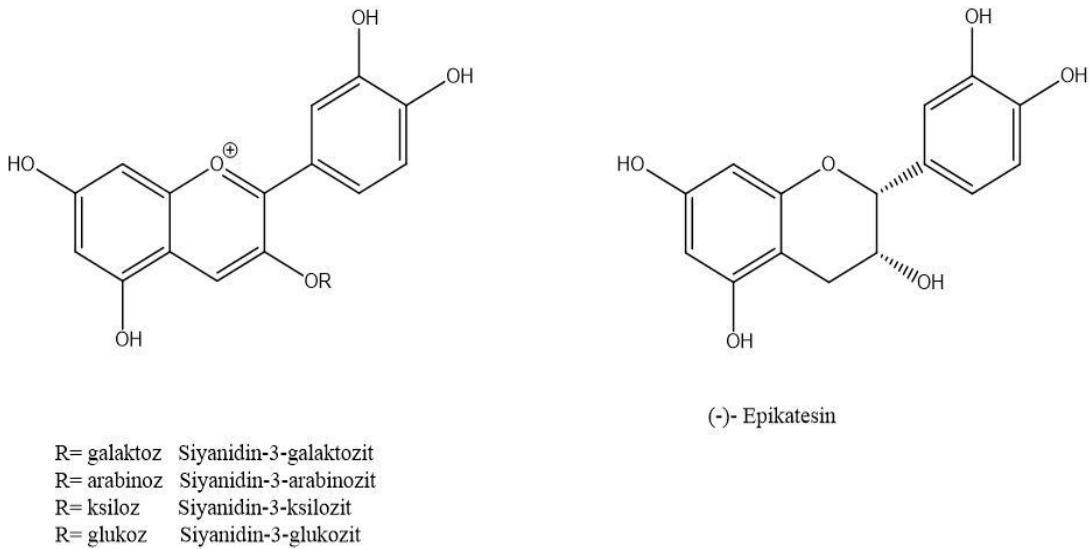
Aronya meyvelerinin içeriğindeki ana flavonollerin prosiyanidinler olduğu ve prosiyanidin miktarının meyvedeki kuru ağırlığın %0,66 ile %5,18 arasında değişmekte olduğu, ikinci en büyük fenolik bileşik grubunun ise antosiyaninler olduğu ve meyvedeki kuru ağırlığın %0,60 ile %2,00 arasında değişen bir konsantrasyona sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Wu vd., 2004; Kokotkiewicz vd., 2010).

Antosiyaninler, bitkilere kırmızı, mavi, mor hatta siyah renklerini veren polifenolik pigmentlerdir (Liu vd., 2018). Günüzümde doğada tanımlanan 600'ün üzerinde antosiyanin bileşiği bulunmaktadır (Smeriglio vd., 2016). *Aronia melanocarpa* meyvesinin koyu mavi rengine, siyanidin 3-glukozit, 3 galaktozit, 3-ksilosit ve 3-arabinozit içeren yüksek konsantrasyondaki antosiyaninler sebep olmaktadır (Hakkinen vd., 1999). Antosiyanidin molekülünün herhangi bir ucundan, bitkideki herhangi şeker ile birleşmesinden antosiyaninler meydana gelir. Bitkilerde en sık gözlenen antosiyaninlerin; pelargonidin, siyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin ve malvidin antosiyanidinlerinin türevleri şeklinde olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1.) (Kong vd., 2003).



Şekil 2.1. Bitkilerdeki altı temel antosiyanidin (siyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, petunidin) (Khoo vd., 2017)

Aronya meyvelerinin fitokimyasal içeriğini; ağırlıklı olarak (-) epikateşinden oluşan polimerik proantosiyantinler oluşturmakta ve ana polifenolik bileşik sınıfını (%66) temsil etmektedir (Şekil 2.2.). İkinci fenolik bileşik grubunu ise antosiyantinler oluşturmakta ve toplam polifenollerin yaklaşık %25'ini temsil etmektedir (Oszmiański ve Wojdylo, 2005). *A. melanocarpa*'daki antosiyantinler esas olarak dört siyanidin glikozitinin bir karışımıdır: siyanidin 3- galaktozit, siyanidin 3-glukozit, siyanidin 3-arabinozit ve siyanidin 3-ksilozit (Şekil 2.2.). Bunlardan siyanidin 3-galaktozit en yüksek konsantrasyonda bulunur. Ayrıca, aronya zengin bir fenolik asit kaynağıdır. Klorojenik ve neoklorojenik asitler meyvelerde tanımlanan en baskın iki fenolik asittir (Slimestad vd., 2005). Yüksek fenolik içeriğinin yanı sıra organik asitler, şeker, yağ, protein, çinko ve potasyum gibi çeşitli mineraller ve vitaminlere de sahiptir (Jakobek vd., 2007).



Şekil 2.2. *Aronia melanocarpa* türünün kimyasal bileşiminde bulunan 4 farklı siyanidin glikozit karışımı ve epikateşin (Kulling ve Rawel, 2008)

Aronya meyvelerindeki buruk tat içeriğindeki kondanse tanenlerden dolayı meydana gelmektedir. Bu sebeple yerken ağızda astrenjan etkiye yani belirgin bir büzüşme hissine sebep olmaktadır (Özdemir ve Eroğlu Özkan, 2020). Tanenler yüksek düzeyde antioksidan etkilerine ilaveten antikanser, antibakteriyel, antiviral ve antienflamatuvar aktivitelere sahip olmalarından dolayı sağlık potansiyeli yüksek bileşikler olarak kabul edilmektedir (Chung vd., 1998). Tanenler; proantosiyanidin olarak da bilinen kondanse tanenler (kateşin ve epikateşin), hidrolize tanenler (elajik ve

gallik asit esterleri) ve tanen türevi bileşikler şeklinde sınıflandırılmaktadır (Güzel, 2021).

2.2.2. Kullanılışları ve biyolojik aktivite çalışmaları

2.2.2.1. *Aronia melanocarpa* etnobotanik kullanımları

Anavatanı olarak bilinen Kuzey Amerika'da yerliler tarafından meyveler öncelikle taze olarak tüketilmiş, daha sonra peksimet yapılarak değerlendirilmiş, gribal enfeksiyonlarda çay şeklinde demlenmiş ve kışın kullanmak üzere yazdan meyveler saklanmıştır (Poyraz Engin, 2020). Taze meyve olarak tüketimine alternatif şekilde kurutulmuş halde, taze sıkılmış suyu, reçel, şerbet, sos, kek ve dondurmaların terkinbinde kullanılmakta, ayrıca gıda endüstrisinde besinlerin renklendirilmesinde doğal hammaddesi olarak değerlendirilmektedir (Yılmaz vd., 2021; Graves, 2013; Tolic, 2015).

Aronya antioksidan aktivitesinin fazla olmasından dolayı yiyecek maddesi olarak tüketiminin yanısıra halk arasında doğal kaynaklı ilaç yapımında da tercih sebebi olmaktadır. Aronyalar Rusya ve birçok Doğu Avrupa ülkesinde tansiyon düşürücü ve damar sertliği oluşumunu engelleyici özellikleri sebebiyle kullanılmıştır (Kokotkiewicz vd., 2010).

Amerika yerlileri olan Kızılderili kabileleri bu meyveleri besin kaynağı olarak, soğukta üşümeyi önlemek için ve tıbbi amaçlı çay yapımında kullanmışlardır. Aronya meyveleri ekşi ve ağzı buran bir yapıda olduklarından ilave işlem görerek bu olumsuz özelliklerinin giderilmesi ile günlük kullanımda daha sık tercih edilir hale getirilebilmektedir. Aronya suyu, zengin içeriği sayesinde diğer meyve sularının flavonoit ve antosiyanin seviyelerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Kokotkiewicz vd., 2010). Yine halk arasında; görsel anlamda güzel olmasından dolayı süs çalısı olarak, konserve yapımında, taze meyvelerin sıkılması ve şarap yapımında hammadde olarak değerlendirilmektedir (Hao vd., 2015; Kokotkiewicz vd., 2010; Yılmaz vd., 2021).

Meyveler, diyabet, kalp damar rahatsızlıkları ve kanser gibi birçok hastalığın meydana gelmesini engelleyen koruyucu etkileri sebebiyle günümüzde özellikle kanser araştırmaları yapan bilim insanları tarafından merak uyandırmaktadır. *Aronia melanocarpa* antioksidan etkinliğinin fazla olduğu, antosiyanin bakımından oldukça zengin bir üzüksü meyvedir. *In vitro* ve *in vivo* yapılan çalışmalarda; mide ülserleri,

kolon kanseri, diyabet gibi hastalıklar üzerine aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir (Jurikova vd., 2017; Bermúdez-Soto vd., 2007a).

Aronya meyveleri içeriğindeki aktif fitokimyasal bileşikler sayesinde, hastalıklardan korunmada ve iyileştirici etkisinden dolayı Rusya’da tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Tedavide en sık kullanıldığı durumlar; soğuk algınlığı, sindirim sistemi hastalıkları, karaciğer, safra kesesi ve çeşitli kalp damar sistemi sorunları olduğu bilinmektedir. İyi kolesterol seviyesini düzenlemekte ve bu sayede kan basıncını normal seviyelere indirerek sağlıklı kan şekeri düzeyini korumada etkin rolü bulunmaktadır. Yine sıklıkla tercih edilen bir diğer kullanımı da vücuttaki savunma sistemini destekleyerek üşütme ve gribal enfeksiyon durumlarına karşı metabolizmayı güçlendirmektir. Zihin gücü ve nörolojik sistemi destekler, yoğun antioksidan etkisi sayesinde yaşlanma ile mücadelede iyi bir savaşçıdır (Knudson, 2009; Hannan, 2013; Fidancı, 2015).

2.2.2.2. Aronia melanocarpa üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları

Oksidatif stres sonucu vücutta oluşan akut ve kronik rahatsızlıkların engellenmesinde ve hasarlarını en aza indirmek için, antioksidan içeriği yüksek gıdaların bol miktarda bulunduğu diyetler tercih edilmektedir (Celep vd., 2012). İçeriğindeki zengin polifenolik bileşenleri sayesinde organizmada biyomoleküllerin oksidasyonunu engelleyen ve farmakolojik etkiye sahip olan doğal ürünler insan beslenmesinde daha fazla tercih edilir hale gelmiştir (Selamoğlu, 2017; Ijaz F., 2017; Selamoğlu vd., 2016).

Antimikrobiyal aktivite:

Halihazırda kullanılmakta olan antibiyotiklere karşı oluşan dirençli mikroorganizmaların sayısındaki hızlı yükseliş, son yıllarda bilim insanlarını doğal kaynaklara yönlendirmiştir (İşcan, 2017). Bunun sonucu olarak; özellikle dirençli suşlar için yeni ve doğal kökenli antimikrobiyal ajanlar keşfetmeye çalışmak büyük bir ihtiyaç halini almıştır (Köse vd., 2016).

Bitkilerdeki antimikrobiyal aktiviteden sorumlu başlıca bileşikler; fenolikler (fenolik asitler, kinonlar, flavonoidler, flavonoller, tanenler, kumarinler), terpenoidler, alkaloidler, lektinler ve polipeptitlerdir (Cowan, 1999; Savoia, 2012).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada; *Aronia melanocarpa* meyve suyu dikkate değer bir hepatoprotektif, çok iyi bir gastroprotektif ve belirgin bir antienflamatuvar

etkinin yanı sıra *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı *in vitro* antibakteriyel aktivite göstermiştir (Valcheva-Kuzmanova ve Belcheva, 2006).

Aronia melanocarpa taze, kurutulmuş ve dondurulmuş meyvelerinin sulu ve etanolik ekstraktlarının gram pozitif bakterilerden *B. cereus* ve *S. aureus*'a, gram negatif bakterilerden ise *P. aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivite sergilediği belirlenmiştir (Liepiņa vd., 2013).

Antioksidan aktivite:

Antioksidanlar; insanlarda metabolizasyon sonucu meydana gelen serbest oksijen radikalleri (SOR) veya serbest nitrojen radikallerinin (SNR) istenmeyen sonuçlarını azaltan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Yılmaz, 2010; Bahorun vd., 2006; Kumar, 2011; Gökgöz, 2015; Daştan, 2017).

Toksinlere ya da patojen maddelere maruziyet, güçlü olmayan antioksidan savunma sistemi, düzensiz hayat tarzı, aşırı egzersiz, metabolik ürünler gibi birçok etken oksidatif strese sebep olmaktadır. Oksidatif stres kendi başına bir hastalık olarak değil, hastalıkların meydana gelmesini sağlayan veya meydana gelme hızını artıran etkenler olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücreler için oksidasyon ve antioksidan oranının normal değerlerde olması istenmekte, hücresel anlamda tüm dokular ve organlar için dolayısıyla da hayatın dengesi için önemli olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres engellenemezse kanser, iskemi, endokrin fonksiyon bozuklukları, moleküler hasarlar, metabolik fonksiyon bozuklukları gibi daha pek çok ciddi sağlık problemine ve dolayısıyla hastalıklara sebep olabilmektedir (Yılmaz, 2010; Chopra ve Wallace, 1998). Serbest radikallerin istenmeyen etkilerinden korunmak için hücreler antioksidanlar üretmekte olmasına rağmen vücuttaki oksidasyon/antioksidan dengesini sağlamak için ilave olarak; Vitamin C, A ve E, içeriğindeki polifenoller sayesinde gıda antioksidanı olarak bilinen tahıl, meyve ve sebzeler tüketilmelidir (Çağlar ve Demirci, 2017; Gökgöz, 2015; Daştan, 2017).

Son zamanlarda, meyve ve sebzelerdeki antioksidan kapasitenin belirlenmesi, biyoaktif fitokimyasalların izolasyonu, karakterizasyonu ve araştırılması günümüzde oldukça kıymet kazanmaktadır. Vitaminler bakımından yoğun içerikli gıda maddelerinin en üst seviyelerinde meyveler bulunmaktadır. Meyveler, askorbik asit, karotenoid, fenoller, flavonoidler ve E vitamini gibi antioksidan aktivite bakımından oldukça öne çıkan doğal kaynaklardır (Gönenç vd., 2014).

Siyah aronya (*Aronia melanocarpa*), geniş bir yelpazede sağlığı geliştirici özelliklere sahip birçok biyoaktif bileşiğin kaynağıdır. Aronya meyvesi ve ürünleri, serbest radikallerin oluşumunu azalttıkları için büyük oranda antioksidan ve sağlığı geliştirme potansiyeline sahiptir (Sidor ve Gramza-Michalowska, 2019).

Tolic ve arkadaşlarının farklı aronya ürünlerini (meyve suları, tozlar, meyve çayı, kapsüller ve kuru meyveler) kalite, fenolik içerik ve antioksidan kapasitelerini kıyaslamalı olarak karşılaştırdığı çalışmada; incelenen ürünlerin yüksek miktarda fenolik madde ve daha düşük miktarda toplam antosiyanin içerdiği, yüksek antioksidan kapasiteye ve indirgeme gücüne sahip olduğu, fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite bazında ise kapsüller ve toz halindeki ürünlerin diğer ürünler arasında önemli oranda öne çıkmakta olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tolic vd., 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; aronyadaki yüksek antioksidan aktiviteden başlıca C vitamini ve antosiyaninler, fenolik asitler, flavanoller, flavonoller ve tanenler olmak üzere polifenollerin sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Jakobek vd., 2007; Benvenuti vd., 2004; Oszmiański ve Wojdylo, 2005).

Obezite ve diyabet:

Aronya meyvelerinin, içeriğindeki fitokimyasal bileşikler sayesinde yüksek glisemik indeks sebebiyle oluşan oksidatif hasarın ve bunun neticesinde meydana gelebilecek sorunların azaltılmasında önemli etkileri olduğu belirlenmiştir (Banjari vd., 2017).

Diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda plazma glikozu ve trigliseritinde streptozotosine bağlı sorunlarda önemli oranda düşme gözlenmiştir. Bunun sonucunda *Aronia melanocarpa* meyve suyunun şeker hastalığı ile ilgili belirtilerin önlenmesi ve kontrolünde faydalı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Valcheva-Kuzmanova vd., 2007).

Pilaczynska-Szczesniak ve arkadaşlarının; eğitim kampı sırasında fiziksel egzersiz yapan kürekçilerde aronya suyunda bulunan artan antosiyanin alımının redoks parametreleri üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada; takviye periyodundan sonra, egzersiz testinden 1 dakika sonra ve 24 saatlik bir toparlanma periyodundan sonra toplanan örneklerdeki tiyobarbitürik asit reaktif madde konsantrasyonları, aronya suyu alan deneklerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak belirlenmiştir. Bu bulgular neticesinde çalışma yazarlar tarafından; artan antosiyanin alımının, büyük olasılıkla endojen antioksidan savunma sistemini güçlendirerek, kırmızı kan

hücrelerinde egzersize bağlı oksidatif hasarı sınırladığını göstermektedir şeklinde yorumlanmıştır (Pilaczynska-Szczesniak vd., 2005).

Antikanser aktivite:

Kanser, dünya üzerindeki ölüme sebep olan hastalıkların başında gelmektedir (Daştan vd., 2016). Günümüzde kanser hastalığında başvuru alan ilaçların istenmeyen sonuçları ve birtakım yetersizlikleri sebebiyle kanser oluşumunu engellemek ve tedavide kullanmak üzere alternatif ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun sonucu olarak; kanser hastalığının tedavisinde ve korunmada doğal kaynaklı biyoaktif maddelerle ilaç formülasyonları oluşturmak için yapılan çalışmalar günden güne artarak devam etmektedir (Dündar vd., 2017).

Flavonoidler, hücresel proliferasyon, apoptoz ve hücre çoğalmasının modülasyonu yoluyla kanserin başlamasına, gelişmesine ve ilerlemesine müdahale edebildikleri için antikanserojenik etkilere sahip güçlü biyoaktif bileşiklerdir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma, flavonoidlerin çeşitli sağlık problemlerinin engellenmesi ve tedavisinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu sebeple; flavonoidlerce zengin içeriğe sahip gıdaların kanser gelişme riskini azalttığı düşünülmektedir (Selamoğlu, 2017).

Aronya meyve ekstrelerinin ilk sırada kolon kanseri olmak üzere daha birçok kanser çeşidinde anti-proliferatif veya koruyucu etkinliğini ortaya koymakta olan çalışmalar mevcuttur (Kulling ve Rawel, 2008). Pankreas kanseri (Thani vd., 2014), meme kanseri (Kedzierska vd., 2010), kolon kanseri (Bermúdez-Soto vd., 2007b) ve daha pek çok kanser türü üzerinde tedavi edici ve oluşumunu engelleyici etkileri çok çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Sharif vd., 2013).

Yapılan bir diğer çalışmada; toplam fenolikler, flavonoidler, prosiyanidinler ve monomerik antosiyaninlerin içeriğine ilişkin olarak iki *Aronia melanocarpa* çeşidinin (Viking ve Aron) ve *Aronia prunifolia* hibridinin antioksidan aktiviteleri, fitokimyasal bileşimleriyle ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; *A. prunifolia* hibritinin *A. melanocarpa* çeşitlerine kıyasla en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve polifenoller, prosiyanidinler ve antosiyaninler açısından en zengin içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Antioksidan etkinlik ile toplam prosiyanidin ve antosiyanin içeriği arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Siyanidin glikozitlerinin, HeLa insan servikal tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği ve bu sayede antiproliferatif aktiviteye sebep olduğu tespit edilmiştir (Rugină vd., 2012).

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında gerekli olan tüm kimyasallar, laboratuvar ekipmanları, çalışmanın bitkisel materyali ve tüm uygulamalar hakkında bu kısımda bilgi verilmektedir.

3.1.1. Çalışmanın bitki materyali

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak *Aronia melanocarpa* türü bitkisinden elde edilen meyveler, 2021 yılı Ağustos ayı sonunda Kırklareli bölgesinde kültür olarak üretimini yapmakta olan firmanın üretim sahasında, doğal habitatında fotoğraflanmış, taze olarak toplanmış ve gölgede kurutularak çalışma materyali olarak hazırlanmıştır.

3.1.2. Çalışmanın sarf malzemeleri

1,1 Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH [•])	Sigma
AlCl ₃ (%99,9)	Fluka
Amil alkol (> %99)	Lachema
Klorojenik asit (> %98)	Sigma
Benzoik asit (> %99,5)	Fluka
NaOH (> %99,9)	Sigma-Aldrich
Na ₂ CO ₃ (> %99,5)	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ (> %99,95)	Kimetsan
NaNO ₂ (> %99)	Merck
Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi	Merck
Sodyum asetat (> %99)	Aklar kimya
Glasiyel asetik asit (%99)	Climax
H ₂ SO ₄ (%98)	Merck
HCl (%37)	Merck
İzopropanol (> %99,7)	Merck
Metanol (%99,8)	Merck
Etanol (%96)	Merck
Etil asetat	Merck
Hekzan (%98,5)	Merck
Agaroz	Sigma
Elektroforez tamponu (10xTBE)	GenAll

Saboraud Dekstroz Broth

Himedia ME033

Mueller Hinton Broth

Accumix® AM1072

3.1.3. Cihazlar ve laboratuvar ekipmanları

- Çeşitli ebatlarda mezürler, balonlar, huniler, erlenmayerler, soğutucular, damlalıklar, damlatma hunileri, ayırma hunileri, beherler, kurutma kağıtları, plastik pipet uçları, yuvarlak tabanlı ve düz tabanlı 96 lı kuyucuklu plaklar.
- UV-Vis Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- pH metre (Hanna HI 221)
- Manyetik ve mekanik karıştırıcılar
- Etüv (Memmert)
- Isıtma için; su banyoları, manyetik ısıtıcı ve karıştırıcılar
- CO₂ inkübatör (Nuaire)
- Laminar-flow kabin (Biohazard)
- Santrifüj (MSE Mistral 1000)
- Liyofilizatör
- Mikro pipetler (GenAll)
- Vorteks (IKA MS3 basic)
- Falkon deney tüpleri
- Rotary Evaporatör (Buchi 200)
- Hassas Terazî (Denver Instrument)
- YPSK (Agilent Technologies 1100 series)
- Öğütücüler (IKA 11 basic, Retsch SK 100)
- Elisa Spektrofotometre (Epoch)
- Saf Su Cihazı (Millipor)
- -80°C dondurucu
- -20°C dondurucu
- +4°C buzdolabı inkübatörler (Bosch)
- UV-VIS transillüminatör
- Yatay jel elektroforezi
- Elektroforez ünitesi
- Güç kaynağı

3.1.4. Kullanılan reaktifler

Deneylerde kullanılmak üzere DMEM-Low-Glucose (Sigma–Aldrich), L-Glutamin Streptomisin (Sigma–Aldrich), MTT Solüsyonu (Applchem A-1080), Mutlak Etil alkol (Sigma), Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE, 5x), Dimetil sülfoksit (DMSO), Tripsin (Applchem), Potasyum klorür (KCl), fosforik asit (H_3PO_4), sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat (NaH_2PO_4), etil alkol (C_2H_5OH), FBS (Sigma–Aldrich), RPMI 1640 (Sigma–Aldrich), asetonitril (Me-CN), Tris-Borik Asit-EDTA (TBE, 10x), Tripsin (Applchem), Sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat (NaH_2PO_4), tiyobarbitürik asit (TBA), 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Merck, Almanya) temin edilmiştir (Daştan, 2017).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan bitkisel materyal taze olarak toplanmış ve uygun şartlarda kurutulmuş ve deney çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Ekstraksiyon

Kurutulmuş meyveler parçalanarak kaba toz haline getirilmiştir. 20 g bitkisel materyal tartılıp ayrı erlenlere alınmış, her birine 100'er mL metanol, %70 etanol, etanol, etil asetat ve hekzan ilave edilerek ağzı kapalı şekilde oda sıcaklığında maserasyona bırakılmıştır (Görsel 3.1.). Ara sıra çalkalanarak maserasyonun tam gerçekleşmesi sağlanmıştır. 24 saatin sonunda maseratlar süzülerek alınmış ve bitkisel materyaller üzerine yeniden 100 mL taze çözücü eklenmiştir. 3 gün süre ile devam eden maserasyon işlemi sonunda toplanan maseratlar rotavaporda düşük ısıda ($40^{\circ}C$) vakum kullanılarak çözücülerinden kurtarılmış (Görsel 3.2.), koyu renkli kapaklı cam kaplarda birleştirilmiş ve % verim hesabı yapılarak deneysel çalışmalarda kullanıncaya kadar $-20^{\circ}C$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

%70 etanol içeren ekstre için önce rotavaporda uçurma işlemi yapılmış sonrasında içerisindeki suyun tamamen uzaklaştırılması amacı ile liyofilizatöre yerleştirilmiştir. Bir hafta sürenin sonunda liyofilizatörde kalan ekstre koyu renkli kapaklı cam kaba alınarak % verim hesabı yapılmış ve deneysel çalışmalarda kullanıncaya kadar $-20^{\circ}C$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Su ekstresi için ise infüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 20 g bitkisel materyal tartılıp erlenlere alınmış, 100 mL sıcak distile su ilave edilerek ağzı kapalı şekilde oda

sıcaklığında 10-15 dakika ara sıra çalkalanarak bekletilmiş, süre sonunda ekstre süzülerek alınmış ve bitkisel materyaller üzerine yeniden 100 mL sıcak distile su eklenmiştir. 3 defa tekrarlanan işlem sonunda toplanan ekstratlar içerisindeki suyun tamamen uzaklaştırılması amacı ile liyofilizatöre yerleştirilmiştir. Bir hafta sürenin sonunda liyofilizatörde kalan ekstre koyu renkli kapaklı cam kaba alınarak % verim hesabı yapılmış ve deneysel çalışmalarda kullanılmaya kadar -20°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Biyolojik aktivite araştırmalarında kullanılmak üzere her bir ekstreten 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılacak stok çözelti konsantrasyonları, su ekstresi için distile su içinde ve diğer ekstratların de dimetilsulfoksit (DMSO) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.



Görsel 3.1. Ekstraksiyon işlemi



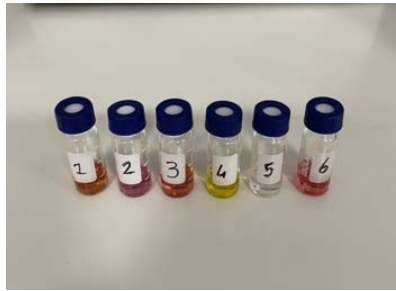
Görsel 3.2. Rotavaporda çözücülerini uçurma işlemi

3.2.3. Analitik çalışmalar

3.2.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Flavon türevleri ve fenolik bileşiklerin YPSK analizleri Agilent 1100 HPLC (Görsel 3.5.) sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (Waters marka) (250mm x 4,6mm x 10µm) kullanılırken mobil faz olarak A: asetonitril:su:formik asit (10:89:1), B: su:asetonitril:formik asit (89:10:1) ile B fazının oranı 15 dakikada %15'ten %40'a, 3 dakikada %40'tan %45'e çıkarılmıştır. %45 oranında 12 dakika stabil kalmıştır. 5 dakikada %45'ten %75'e, 3 dakikada %75'ten %85'e getirilmiştir. Bir dakikada %85'ten %95'e çıkarılmış ve 40 dakikada %100 oranına ulaşacak şekilde gradient akış olarak çalışılmıştır. Akış hızı 0,7 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Pikler 330 nm'de dedekte edilmiştir (Karadağ vd., 2019). Stok olarak 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ekstrelerden; metanol, %70 etanol, etanol ve su kendi çözücülerini ile, etil asetat etanol ile ve hekzan DMSO ile çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

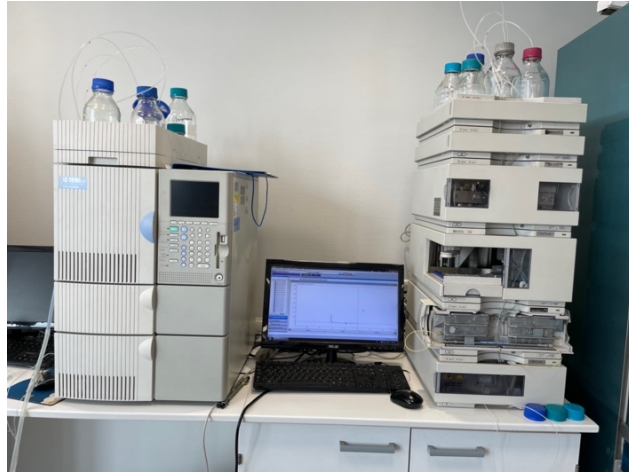
Antosiyanin bileşiklerinin YPSK analizleri Agilent 1100 HPLC sistemine bağlı DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (250mm x 4,6mm x 10µm) kullanılırken mobil faz olarak A: su:formik asit:asetik asit (100:0,7:0,9), B: asetonitril ile 0-30 dakika arasında %10 B'den %90 B konsantrasyonuna lineer gradient akış olarak çalışılmıştır. 30-35. dakikalarda ise %90 B'den %10 B'ye geri dönmüştür. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Pikler 530 nm'de dedekte edilmiştir (Farina vd, 1995). Çalışılan ekstreler 10 mg/mL konsantrasyonda çalışılmış olup ekstrelerden; metanol, %70 etanol, etanol ve su kendi çözücülerini ile, etil asetat etanol ile ve hekzan DMSO ile çözüldükten sonra 0,22 mikron membran filtreden süzülerek analiz edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır (Görsel 3.3. ve Görsel 3.4.)



Görsel 3.3. HPLC cihazı için hazırlanan ekstre örnekleri



Görsel 3.4. HPLC cihazı için hazırlanan standart maddeler

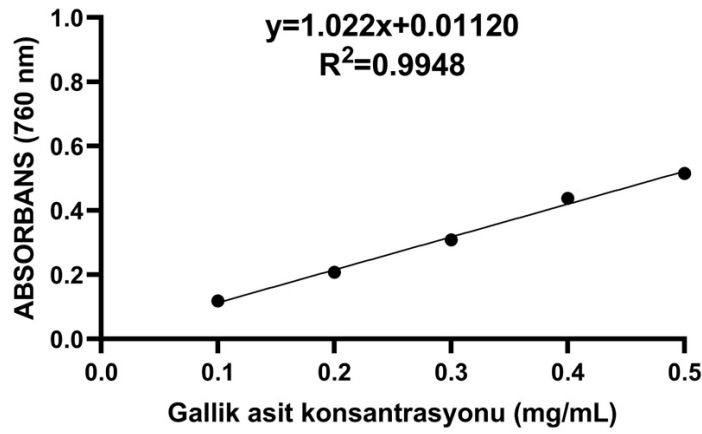


Görsel 3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı (Agilent 1100 HPLC)

3.2.3.2. Toplam fenolik madde miktar tayini

Aronya bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan ekstralarının toplam fenolik madde miktarlarının analizi Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Bu yöntem, suda ve çeşitli organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (Barut Uyar vd., 2013; Demir vd., 2014; Gökgöz, 2015; Cemeroğlu, 2007; Fersahoğlu, 2016; Dünder, 2017; Yıldız, 2019). Reaksiyon sonucu oluşan mor-menekşe renkli kompleks 760 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermektedir. Ekstrelerin içermiş oldukları fenolik bileşen miktarları da UV-VIS (Ultraviyole-görünür bölge) spektrofotometresi ile absorbands değerlerinin elde edilmesiyle birlikte rakamsal kantitatif olarak analiz verilerine dönüştürmektedir. Ekstrelerin her birinden 0,2 mL ekstre (1mg/mL) solüsyonu alınmış ve üzerlerine 2,5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi (0,2 N) eklenerek karıştırılmıştır. 5 dakika sonra her bir karışıma 7,5 mL Na_2CO_3 (%7,5) eklenmiş ve aralıklı çalkalama ile oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. 30 dk inkübasyon sonrasında 760 nm' de UV/VIS spektrofotometre cihazı ile numunelerin

absorbans değerleri ölçölmüştür (Gamez-Meza vd., 1999; Horzic vd., 2009; Dünder, 2017; Yıldız, 2019). Bir fenolik madde olarak Gallik asitin farklı konsantrasyonları hazırlanarak (0,05-0,50 mg/mL) standart grafik çizildi (Şekil 3.1.). Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y=1,022x + 0,0112$ olarak tespit edildi. Standart grafiğe göre tüm bitki ekstrelerindeki toplam fenolik madde mg gallik asit/g ekstre olarak hesaplandı (Lee vd., 2015; İzol, 2021) ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi (Dinçer ve Akçay, 2000; İşbilir, 2008; Özenç, 2011; Huang vd., 2005; Dünder, 2017; Yıldız, 2019, Arıkan, 2019).



Şekil 3.1. Gallik asit standart grafiği

Toplam Fenolik içeriğin hesaplanmasında kullanılan eşitlik aşığıdaki gibidir:

Total Fenolik Madde (TFM) (mg/mL) = [(Absorbans – 0,0112)/1,022] × Dilüsyon Faktörü

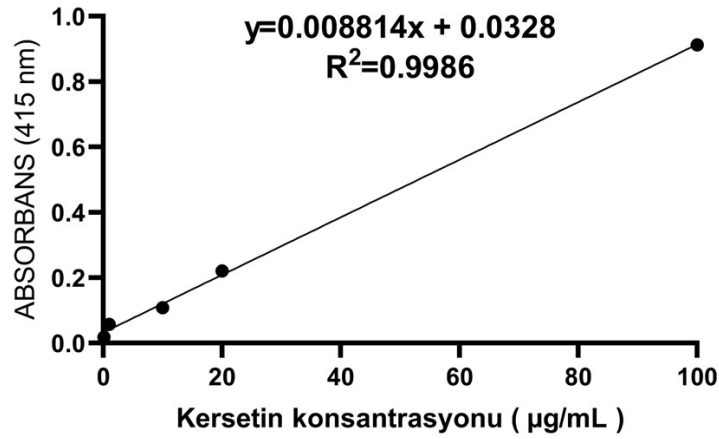
Dilüsyon faktörü: 50 kat alındı.

[Örnek hacmi: 0,2 mL+2,5 mL Folin ciocalteu+ 7,3 mL Na₂CO₃. Böylelikle toplam hacim 10 mL olur. Ekstre hacmi 0,2 mL olduğu için 50 kat seyreltme vardır].

3.2.3.3. Toplam flavonoit miktar tayini

Toplam flavonoit miktarı Alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik metodunun modifiye edilmesiyle tayin edildi (Aydın, 2021). Bitki ekstrelerinden 250 µL alındı ve üzerine 50 µL %5' lik NaNO₂ çözeltisi ilave edildi. Her bir tüpün üzerine metanol içinde hazırlanmış %10 (w/v) AlCl₃ çözeltisinden 200 µL ve 200 µL (1 M) potasyum

asetat ve 5.3 mL distile su eklendi. Karışım oda şartlarında 30 dk. bekletildikten sonra 415 nm dalga boyunda UV spektrofotometre cihazında okutuldu (Chang vd., 2002; Yıldız, 2019; Gajula vd., 2009; İçli, 2017). Diğer taraftan 200 mg/L konsantrasyonda kersetin stok çözeltisi hazırlandı ve bu konsantrasyondan seyreltme ile 0,1-1,0-10,0-20,0-100 µg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyon elde edildi. Standart kersetin çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.2.) (Arvouet-Grand vd., 1994). Sonuç verileri numunelerin toplam flavonoit içeriği olarak µg QE/g bitki olacak şekilde kersetin eşdeğeri olarak ifade edildi (Arvouet-grand vd., 1994; Gökgöz, 2015; İçli, 2017; Aydın, 2021).



Şekil 3.2. Kersetin (quercetin) standart grafiği

Toplam flavonoit içeriğinin hesaplanmasında kullanılan eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$\text{Total Flavonoit Miktarı (TFM) (}\mu\text{g/mL)} = [(\text{Absorbans} - 0,0328)/0,008814] \times$$

Dilüsyon Faktörü

Dilüsyon faktörü: 24 kat alındı.

[Örnek hacmi: 250 µL+ 50 µL NaNO₂ çözeltisi + 200 µL %10'luk AlCl₃ çözeltisi ve 200 µL potasyum asetat ve 5300 µL distile su şeklinde oluşturuldu. Böylelikle toplam hacim 6 mL olur. Ekstre hacmi 250 µL olduğu için: 250/6000= 24 kat seyreltme vardır].

3.2.3.4. Toplam antosiyanin miktar tayini

Toplam antosiyanin içeriğini belirlemek için pH diferansiyel metodu kullanıldı (Fersahoğlu, 2016). Buna göre bitki ekstratlarıyla oluşturulan ortamın pH 1.0 ve pH 4.5 olduğu koşullarda spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değerlerinin farkının, doğrudan antosiyanin konsantrasyonu ile orantılı olduğu mantığını benimseyen bir

prensip kullanılmaktadır. Yöntemin duyarlılık aralığı yüksektir. Bu analiz için 0,025 M potasyum klorür tampon çözeltisi (pH 1.0) ve 0,4 M sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 4.5) kullanıldı (Fersahoğlu, 2016). Örnekler, potasyum klorür tampon çözeltisi ile absorbans 0,4-0,6 olacak şekilde seyreltildi. Bu ilkelere göre yapılan seyreltmenin seyreltme faktörü hesaplandı. 510 ve 700 nm de absorbanslar elde edildi ve değerler kaydedildi. Toplam antosiyanin miktarı, siyanidin-3-glukozit cinsinden aşağıda verilen eşitliğine göre hesaplandı (Kırca, 2004; Fersahoğlu, 2016).

$$\text{Toplam Antosiyanin İçeriği} = (A \times MA \times SF \times 1000) / MS$$

$$A(\text{Absorbans farkı}) : (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}$$

MA: Siyanidin-3-glukozidin molekül ağırlığı: 449,2

SF: Dilüsyon faktörü

MS: Molar soğurum katsayısı (26900)

3.2.4. Biyolojik aktivite çalışmaları

3.2.4.1. Antioksidan aktivite tayinleri

3.2.4.1.1. DPPH[•] (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini giderme aktivitesi

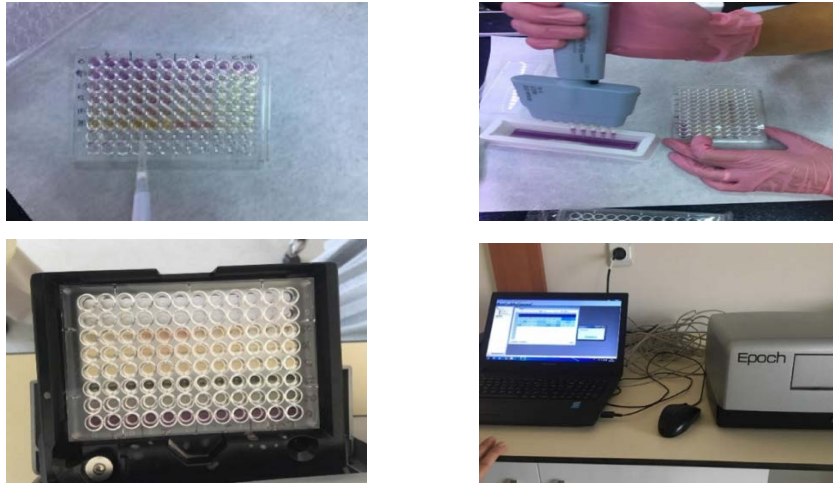
Serbest radikal DPPH[•] metodu (Cuendet vd., 1997), antioksidanların serbest radikalini giderme kapasitesini belirleyen, pratik ve güvenilirliği yüksek olan bir yöntemdir. DPPH[•] kararlı yapıda bir azot radikalidir ve ticari olarak satılmaktadır. DPPH[•]'ın etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm'de absorbansı ölçülür. DPPH[•] çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle, antioksidan tarafından indirgenme sonucunda solarak çözeltinin rengi sarıya doğru kayar, bu yüzden reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir (Frankel ve Meyer, 2000; Eren, 2011).

Bu test kapsamında her numunenin MeOH (metanol)'deki stok çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Filtrasyon yapıldıktan sonra saydam stok çözeltilerden, 96-kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının ilk sütununa sırasıyla 200'er µL aktarıldı. Çok-kanallı pipet aracılığıyla, eşit miktarda MeOH içinde 8 seri seyreltme yapılarak, 5 dakika boyunca vortekste karıştırıldı. DPPH[•] stok çözeltisi 2 mg DPPH[•]'ın 25 mL MeOH'de çözünmesiyle son konsantrasyonu 80 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µL DPPH[•] çözeltisinden eklenerek tepkime başlatıldı ve 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletildi (Goyal ve Tailor, 2014; İzol, 2021). Askorbik asit aynı konsantrasyonda pozitif kontrol, DPPH[•] + MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı plaklara uygulandı. UV absorbans 517 nm'de

mikroplate spektrofotometre (Epoch) kullanılarak oda sıcaklığında okuma yapıldı (Görsel 3.6.) (İzol, 2021). Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ve istatistiksel değerlendirme ve hesaplamalarda GraphPad Data Analysis programı kullanıldı.

DPPH[•] % İnhibisyon konsantrasyonu değeri şu formül ile hesaplandı (Dündar, 2017; Arıkan, 2019);

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$



Görsel 3.6. DPPH[•] analizi uygulamaları

3.2.4.1.2. ABTS^{•+} (TEAC-Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi)

2,2'-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS^{•+}) radikal giderici etki, standart TEAC metodu (Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi Papandreou vd. (2006), Re vd. (1999) ile Ardağ (2008) tarafından kullanılan yöntemlerin optimize edilmesiyle gerçekleştirildi.

Deney protokolünde, 7 mM ABTS^{•+}'nin distile sudaki çözeltisinden 50 mL ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisinden 25 mL alınarak karıştırıldı ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Kullanıma hazır hale gelen mavi yeşil renkli ABTS^{•+} radikal çözeltisi, 734 nm'de absorpsiyon 0,8- 0,7 olacak şekilde etil alkolle 1:80 oranında seyreltilti. Standart olarak kullanılan troloks çözeltileri sırasıyla 3; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mM konsantrasyonlarda hazırlandı. 10 μ L örnek ve 990 μ L hazırlanan ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılarak, 734 nm'de absorbansı ölçüldü. Ölçümler sonucu troloks için linear doğru denklemi oluşturuldu (Badarinath vd., 2010; Gökgöz, 2015; Dündar, 2017; İzol, 2021).

Numaralandırılan ependorf tüplere 1'er mL bu ABTS^{•+} radikal çözeltisinden ilave edilip üzerlerine 10 µL örnek (100 mikrogram/mL ekstre) çözeltilerinden eklendi. 1. ve 6. dakika sonunda 734 nm'de absorbans değerleri okundu. 1. dakikadaki absorbans değerinden (A1) 6. dakikadaki absorbans değeri (A6) çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. ΔA değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon değerleri hesaplandı ve örnek konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi.

$$\% \text{ inhibisyon: } [(A6-A1)/A1] \times 100$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\Delta A/A1) \times 100$$

İlk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen TEAC yöntemi (Miller vd., 1993), antioksidanların varlığında, çözeltideki ABTS^{•+} radikalinin absorbansındaki düşüşün hesaplanmasına dayanmaktadır (Rice-Evans ve Miller, 1984; Re vd., 1999; Ardağ, 2008; Badarinath vd., 2010; Gökgöz, 2015, İzol, 2021).

3.2.4.1.3. Metal şelatlama aktivitesi

Bitki ekstralarının metal şelatlama aktiviteleri, Dinis vd. (1994)'nın ve Decker ve Welch (1990) belirledikleri yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak (Decker ve Welch, 1990; Dinis vd., 1994; Parlak ve Çelik, 2015; Gültekin ve Öztürk, 2020) gerçekleştirildi. Bu işlem için farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 250 ve 500 µg/mL) bitki ekstralarından 0.4 mL alınarak 2 mM'lık ve 0,05 mL FeCl₂ çözeltisine ilave edildi. Daha sonra reaksiyona 0,2 mL, 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilave edilerek kuvvetlice vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm' de absorbansı kaydedildi. Standart antioksidan olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı (Parlak ve Koparır, 2018).

Her bir ölçüm 3 tekrarlı olarak yapılarak ortalamaları hesaplandı. Yüzde metal şelatlama aktivitesi şu formülden hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Metal şelatlama aktivitesi} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A₀= Kontrol Absorbansı

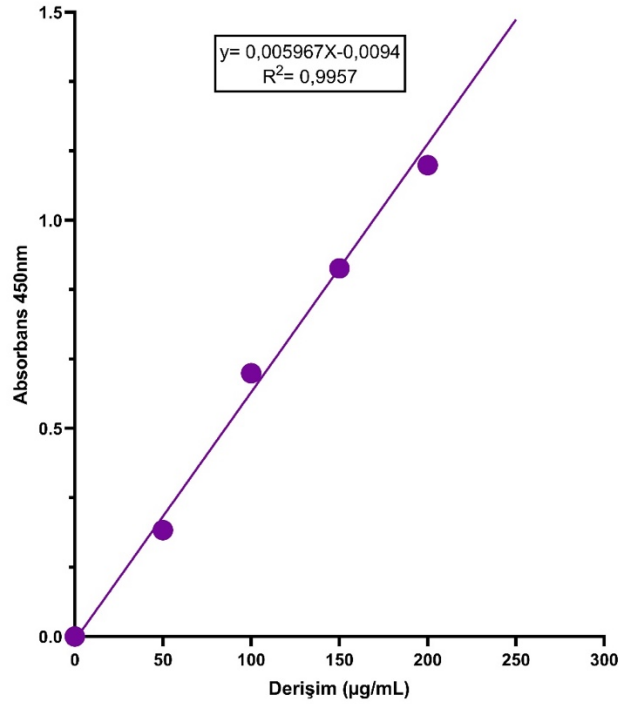
A₁= Numunelerin ve/veya standartların Absorbansı (Parlak ve Koparır, 2018).

3.2.4.1.4. CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite)

Bu test, bakır (II)-neokuproin kompleksinin, antioksidanların varlığında bakır(I)-neokuproin'e indirgenmesi esasına dayanır. İçerisinde antioksidan bulunmayan bir referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesiyle analiz gerçekleştirilir (Apak vd., 2004; Eren, 2011; Ardağ, 2008; Badarinath vd., 2010; Gökgöz, 2015). Test

sonuçları troloks eşdeğeri antioksidan kapasite cinsinden, $TEAC_{CUPRAC}$ olarak ifade edilir. (Apak vd., 2004; Ardağ, 2008; Eren, 2011).

Bu çalışma kapsamında Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini Güçlü vd. (2006) ve Eren (2011)'in yöntemlerinin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi (Güçlü vd., 2006; Eren, 2011). 1×10^{-2} M $CuCl_2$, $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltileri ve amonyum asetat tamponundan (pH: 7) 1'er mL alındı. Üzerlerine son hacim 4,1 mL olacak şekilde, 600 μ L ekstre çözeltisi ve 500 μ L ekstre çözgeninden ilave edilip iyice çalkalanarak, oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletilip 450 nm'de absorbanslar okundu. Standart olarak troloks ve C vitamini kullanıldı. Troloks için elde edilen grafiğin eğimi (Şekil 3.3.) ile örnekler için elde edilen doğruların eğimleri oranlanarak CUPRAC aktivitesi ($TEAC_{CUPRAC}$) olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. Troloksun kalibrasyon eğrisi ($R^2=0,9957$)

3.2.4.1.5. HUVEC ve L929 hücre kültürlerinde lipid peroksidasyonu tayini

Çalışmamız kapsamında; 1-1000 μ g/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda aronya meyve ekstrelerinin, HUVEC ve L929 hücre hattına uygulanması sonucu *in vitro* koşullarda sağlam hücre kültürlerinde meydana gelen değişimlerin ve hücrelerin antioksidan yükündeki değişimlerin bazı biyokimyasal parametreler ortaya konulması hedeflendi. Bunun için aronya bitki ekstrelerinin uygulanması ile, HUVEC ve L929

hücrelerindeki lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi analizi yapıldı.

Biyokimyasal parametrelerin analizlerinin yapılabilmesi için, hücre kültürlerinde aronya bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanmış ekstreleri 24 saat süresince uygulandıktan sonra, hücre numunelerine 1/9 (v/v) oranında fosfat tamponu (pH=7,4; 50 mM) eklendi ve soğutuculu ortamda homojenizasyon işlemleri gerçekleştirilerek, homojenizatlar, 3000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar Malondialdehit (MDA) düzeylerinin analizi için kullanıldı.

Malondialdehit (MDA) düzeylerinin analizi:

Hücreler patlatılarak hücre içlerindeki MDA düzeyleri, Daştan vd. (2014)'nin önerdiği metod ile belirlendi. Tiyoarbitürik asit (TBA) ile 90-95 °C'de reaksiyona giren MDA'nın oluşturduğu, pembe renkli kromojen moleküller, spektrofotometrik olarak 532 nm'de okundu ve absorpsanları kaydedildi. Elde edilen sonuçlar nmol/g proteini olarak ifade edildi (Esterbauer ve Cheeseman, 1990; Daştan vd., 2014).

3.2.4.2. Antimikrobiyal aktivite

3.2.4.2.1. Mikrobiyal suşlar

Araştırmamız kapsamında incelediğimiz aronya bitkisi meyve ekstrelerinin antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri, çeşitli bakteri ve 1 adet maya mantarı suşu kullanılarak, Mikrodilüsyon Broth yöntemi (Eloff, 1998) kullanılarak, Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin bulunması ile değerlendirildi. Test edilen mikroorganizmalar olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus kochii* ve *Candida albicans* suşları kullanıldı. Bitki ekstreleri %40 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülerek stok çözeltiler hazırlandı. Bakteriler için Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072), *Candida albicans* için Saboraud Dekstroz Broth (Himedia ME033) besiyerleri kullanıldı. 96'lık mikrotitre plakalarının ilk sırasındaki kuyucuklara 90 µl, diğer kuyucuklara 50'şer µl besiyeri eklendi. 11. Sıradaki kuyucuklar sterilite kontrol olarak kullanıldı ve 100 µl besiyeri eklendi. 12. Sıradaki kuyucuklar ise üreme kontrol olarak kullanıldı. İlk sıradaki kuyucuklar üzerine 10 µl ekstre eklendi ve seri sulandırım yapıldı. MHB Kanlı agar besiyerinde üreyen mikroorganizmalardan öze ile alınarak mikroorganizmalardan McFarland 0,5 bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Bakteriler için 5×10^5 CFU/mL, *Candida albicans* için $0,5-2,5 \times 10^3$ CFU/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µl mikroorganizma süspansiyonu eklendi. Bakteri eklenen

plaklar 37 °C’de, *Candida albicans* eklenen plaklar 35 °C’de 16-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görünür hale gelmesi için her kuyucuğa 50 µl 2 mg/mL 2,3,5-Trifenil-tetrazolyum klorür (TTC) (Merck, Germany) eklendi ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Testler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Kuyucuklarda renk değişiminin olmadığı ilk kuyucuklar MİK değeri olarak kabul edildi (Saraç vd., 2018a, 2018b).

3.2.4.3. *In vitro* antitümör aktivite belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında aronya bitkisi meyve ekstratlarının *in vitro* antitümör aktivitelerinin belirlenmesi için; meme kanseri (MCF-7) ve insan servikal adenokarsinoma (HeLa) hücre hatları kullanıldı. Kanser hücre hatları, DMEM içerisinde 75’lik flasklarda CO₂ inkübatöre kaldırılarak, yeterli oranda çoğalmaları için inkübe edildi (Saraç vd., 2018a, 2018b).

Hücre hatları, 37 °C’ lik %5 CO₂ içeriğine sahip bir etüv içinde 25 cm² flasklarda, DMEM (yüksek glukoz, 2mM L-glutamine ve sodyum piruvat) ve %10 FBS içeren besiyerlerinde kültüre edildi. Pasajlama durumuna gelen flasklar seçilerek ekim işlemine başlandı. Bu işlem steril bir laminar Flow-kabinde gerçekleştirildi. Ekim için tercih edilen flaskların ortamı boşaltıldı. Flaska yapışan hücrelerin kaldırılması amacı ile ortama 5 mL Tripsin-EDTA solüsyonu (%0.25) ve fosfat tamponu (PBS) eklendi. Tripsinin üzerine 15 mL DMEM eklendi ve pipetaj yapılarak flaskların içerisindeki iyice yıkanması sağlandı. Flasklar daha sonra bir flask bir falkon olacak şekilde falkonlara aktarıldı. Hücrelerin 96’lık hücre kültürü plakalarına ekilmesi için uygun şekilde çoğaldıklarının belirlenmesi ve sayım yapılması amacıyla Tripan mavisi ile boyama yapılarak, Thoma lamı ile invert mikroskop kullanılarak sayım işlemleri yapıldı (Saraç vd., 2018a, 2018b). Falkonlar 2000 rpm hızda 8 dakika santrifüjlendi ve santrifüj işleminden sonra hücrelerin falkonların alt kısmında toplanması sağlandı. Üst faz dökülerek, falkonlara yavaş yavaş vurularak hücreler kaldırıldı ve hücrelerin üzerine 20 mL DMEM ve 5 mL FBS eklendi. 96 kuyucuktan (100 µl/plate boşluğunda 5x10³ hücre olacak şekilde) her birine 200 µL lik karışım konuldu. İşlem bitiminde 96 kuyucuklu plaklar inkübatöre (Autoflow IR) kaldırıldı (Görsel 3.7.) (Saraç vd., 2018a, 2018b).



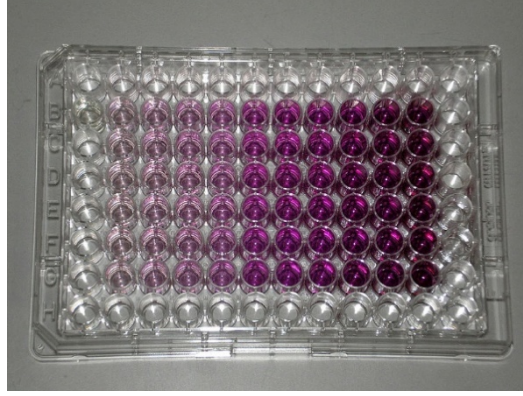
Görsel 3.7. CO₂ inkübatörü

Hücrelere bitki ekstralarının uygulanması ve hücre büyüme performanslarının belirlenmesi:

96 kuyucuklu plaklara ekilen hücrelerin üzerine sırasıyla farklı konsantrasyonlardaki ekstralar 3 tekrarlı olacak şekilde eklendi ve işlem bitiminde 96 kuyucuklu plaklar inkübatöre kaldırıldı, hücre kültürleri 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, hücre büyüme performansları Zeiss Axio inverted mikroskop (10x)'lu görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğrafları çekildi. Hücreler %1 SDS içeren PBS tamponu içinde izole edildi ve methylene blue solüsyonu ile boyandı. Yaşayan ve büyüyen hücrelerin sayımının yapılması amacıyla metilen mavisi boyası kullanıldı.

Hücrelere MTT uygulanması ve canlılık tespiti:

24 saat sonra, 10 mikrolitre 12 mM MTT (Vybrant, Invitrogen) solüsyonu kuyucuklara ilave edildi ve %5 CO₂ kapasitesine sahip etüvde 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Hücrelerin sitotoksik aktivitesini belirlemek için 4. saat sonunda oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de mikropłaka okuyucuda (Thermo, ABD) ölçüldü (Görsel 3.8. ve Görsel 3.9.). MTT deneyleri sonucunda Graphpad programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve ardından grafikler oluşturulmuştur. Bileşiklerin seçicilik indeksi (SI), sağlıklı hücre hattındaki IC₅₀/kanser hattındaki IC₅₀ oranı elde edilerek hesaplanmıştır (Al-Qubaisi vd., 2011).



Görsel 3.8. *MTT reaksiyonu hazırlanmış 96 kuyucuklu plak*



Görsel 3.9. *MTT reaksiyonu hazırlanan platelerin absorbans değerlerinin okunduğu Elisa plate okuyucu*

3.2.4.4. *In vitro* sitotoksik aktivite belirlenmesi

Çeşitli biyotik veya abiyotik faktörler, Kimyasal ve biyolojik maddeler hücreleri değişik derecelerde etkileyerek sitotoksositeye yol açabilirler. Bir maddenin hücreler üzerindeki biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için sağlam hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir. *In vitro* sitotoksosite testleri, ilaç niteliği taşıyan, ilaç olma potansiyeli bulunan sentetik veya doğal, bitkisel veya mikroorganizma kaynaklı doğal ekstre ve ürünlerin veya toksik profili araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen yöntemlerdir. Bu tez kapsamında *in vitro* sitotoksosite araştırması için insan endotelial hücre (HUVEC) hattı

ve fare fibroblast hücre (L929) hattı kullanılmıştır. Hücre kültürlerinde, çok sayıda aday bileşiğin veya ekstraların kısa sürede analiz edilmesi mümkün olmakta ve yapılacak hayvan denemeleri için temel veriler elde edilebilmektedir. Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksikite testi bulunmakla birlikte bu tez projesi kapsamında MTT testi kullanılmıştır. Tetrazolyum tuzları, heterosiklik organik bileşiklerdir. Tetrazolyum bileşikleri ile yapılan canlılık testlerinde ilk aşamada hücreler 24 saat bitki ekstraları ile inkübe edildi. MTT solüsyonu hazırlandı (5mg/ml), bunun için MTT kimyasalı, dH₂O içinde çözündürüldü ve kullanmadan önce süzüldü. İkinci aşamada 96 kuyucuklu plaklarda inkübe edilmekte olan mediumlar boşaltıldı ve hücre kültürleri üzerine 50 mL MTT tetrazolyum bileşiği ve 50 mikrolitre yeni besiyeri eklendi. Ortalama 1-4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Bu esnada canlı hücreler tetrazolyum tuzunu indirgeyip formazana dönüştürerek mor renk oluşumu gerçekleştirirken, ölü hücreler mitokondrileri artık çalışmadığı için renk dönüşümünü başaramamaktadır. Spektrofometre için formazan kristallerini çözmek için 200 mikrolitre DMSO çözücüsü ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak homojenleştirilmesi sağlandı. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik yöntemle 570 nm dalga boyunda ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlendi (Tokur ve Aksoy, 2017; Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004). Elde edilen spektrofotometrik veriler, Graphpad programında IC₅₀ değerlerine dönüştürülerek, aronya bitkisi meyvelerinden yapılan 6 farklı ekstretenin HUVEC ve L929 hücrelerinde herhangi bir öldürücü toksik etkilerinin olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.2.4.5. DNA hasarını önleyici aktivite

DNA hasarının tayininde veya DNA koruyucu aktivitelerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılsa da tüm laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. Agaroz jel elektroforez tekniği, çeşitli amaçlarla izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanması, hangi formda olduklarının belirlenmesi, boyutlarının belirlenmesi ve özellikle değişiklikler sonrası elde edilen yeni formların incelenmesi açısından moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistemdir. (Takım, 2010).

Plazmit DNA'sının üç formu vardır:

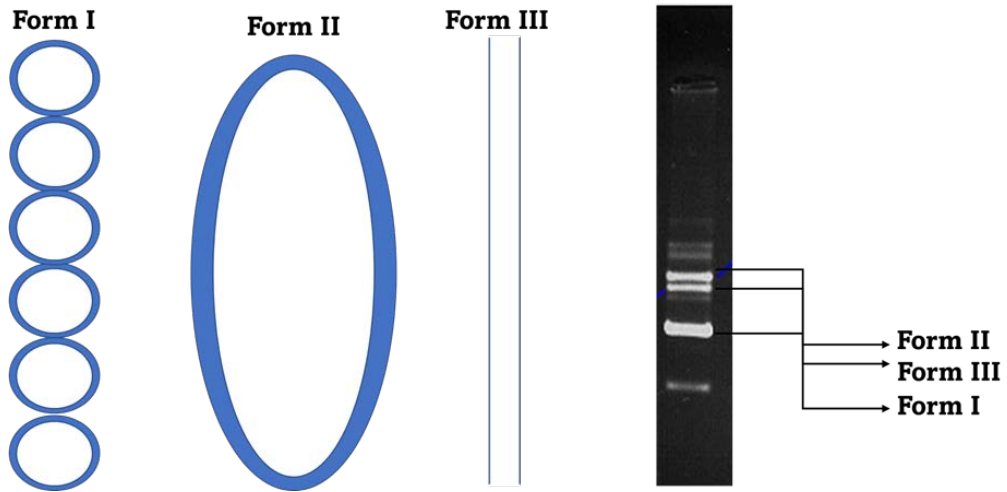
i) Süper sarmal (süpercoiled, DNA üzerinde kırık zincir yoktur ve çok yoğun dairesel komplekstir, Form I);

ii) açık dairesel (DNA zincirlerinden birinde kırık bir zincir var ve DNA molekülü hala dairesel DNA, Form II);

iii) lineer (DNA dubleks zincirinde iki kırık zincir vardır, yani dairesel değildir, lineer çift gerilmiş DNA'ya dönüşür, Form III)

Agaroz Jel Elektroforezinde bu formlar farklı hızlarda hareket eder (Takım, 2010). Form I, yük yoğunluğunun azlığı ve küçük hacmi nedeniyle jelde en hızlı hareket eder. Form II biraz daha yoğun olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III, Form I ve Form II arasında bir hacimde olduğu için her iki bandın arasında bir seviyede konumlanır (Şekil 3.4.; Takım, 2010).

Bu yöntemle göre, bitki ekstrelerinin DNA hasarını önleme yeteneği, DNA'ya zarar veren faktörler olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve UV ışığı varlığında değerlendirilmiştir. Form I, sağlam kovalent olarak kapalı dairesel formdadır ve hızlı hareket eder. Eğer bir zincir üzerinde değişiklik meydana gelirse, süper-sarmal form, daha yavaş hareket eden bir açık dairesel form II oluşturmak için gevşeyecektir. Her iki çift zincir de herhangi bir faktör tarafından bölünürse, form I ve form II arasında göç eden lineer form III oluşmaktadır.



Şekil 3.4. Plazmit DNA'sının farklı formları (Takım, 2010).

Genellikle bir ilacın antineoplastik aktivitesinin, hücresel DNA ile etkileşimine dayandığı kabul edilir. Hücre DNA hasarını gideremezse, hücreler metabolik yollardan biri ile ölürler (Boğatarkan vd., 2015; Wang ve Lippard, 2005).

3.2.4.5.1. Elektroforez metodu

DNA, protein, karbonhidrat, RNA gibi doğal olarak pozitif veya negatif yükü bulunan moleküller veya çeşitli ön işlemlerden sonra yüklendirilmiş tüm bileşikler elektroforez yöntemi ile ayrıştırılabilmektedir. Elektroforez işleminde her molekülün ayrıştırılması için farklı tamponlar kullanılabildiği gibi, aynı molekül için Tris-Asetat-Edta (TAE), Tris-Borik asit-Edta (TBE) gibi farklı tamponlarda tercih edilebilmektedir.

3.2.4.5.2. DNA koruyucu aktivitenin tespiti

Ekstrelerin, DNA'yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmit DNA'si (Thermo) kullanılmıştır. Plazmit DNA'sı, ekstrelerin varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılarak hasar oluşmasına çalışılmıştır. Russo vd. (2000) tarafından belirlenen metodda bir miktar değişiklik yapılarak Takım (2010) ve Berk (2012) tarafından optimize edilen yöntem kullanılmıştır (Berk, 2012; Takım, 2010; Russo vd., 2000). %1,5'lik agaroz jel hazırlanarak, DNA bantlarının görüntülenmesine çalışılmıştır.

DNA koruyucu aktivite için bitki ekstrelerinden öncelikle %10,0'luk stok derişimler hazırlanması yoluna gidilmiştir. Ekstrelerin %10,0'luk stok derişimlerinin hazırlanması amacıyla ekstrelerden sırasıyla 100 mg tartılarak üzerlerine 1000 µL distile su eklenmiştir. Ekstrenin tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Stok bitki ekstrelerinin seyreltilmesi basamağında:

1/10 oranında seyreltme için 5 µL stok ekstre üzerine 45 µL distile su (dH₂O) eklenmiştir.

1/5 oranında seyreltme için 10 µL stok ekstre üzerine 40 µL distile su (dH₂O) eklenmiştir.

1/2,5 oranında seyreltme için 20 µL stok ekstre üzerine 30 µL distile su (dH₂O) eklenmiştir.

1/1,25 oranında seyreltme için 40 µL stok ekstre üzerine 10 µL distile su (dH₂O) eklenmiştir.

Plazmit DNA'sında hasar oluşturma ve bitki ekstrelerinin etkisinin incelenmesi:

2 ml'lik eppendorf tüpler sırasıyla etiketlenir ve içlerine aşağıdaki bileşenler konularak deney prosedürü uygulanır.

1. Kontrol: Plazmit DNA (3 µL) + dH₂O (6 µL) konulur.

2. Kontrol: Plazmit DNA (3 µL) + dH₂O (6 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

3. Kontrol: Plazmit DNA (3 µL) + dH₂O (6 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

4. Kontrol: Plazmit DNA (3 µL) + dH₂O (6 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur.

5. Plazmit DNA (3 µL) + Bitki ekstresi (5 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

6. Plazmit DNA (3 µL) + Bitki ekstresi (5 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

7. Plazmit DNA (3 µL) + Bitki ekstresi (5 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

8. Plazmit DNA (3 µL) + Bitki ekstresi (5 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

9. Plazmit DNA (3 µL) + Bitki ekstresi (5 µL) + H₂O₂ (1 µL) konulur + UV ışık altında 5 dk bekletilir.

5 nolu tüpe 1/10, 6 nolu tüpe 1/5, 7 nolu tüpe 1/2,5, 8 nolu tüpe 1/1,25 oranında seyreltme yapılan bitki ekstraktlarından 5,0 µL konulmuştur. 9. tüpe ise seyreltme yapmadan doğrudan 5,0 µL stok ekstre çözeltisi eklenmiştir. Tüplerin içerisine 3,0 µL pBR322 plazmit DNA'sı ve 1,0 µL %30'luk H₂O₂ konulmuştur. Bitki ekstraktlarının olduğu tüpler, 3. ve 4. tüpler ile birlikte 5 dk süresince UV ışınlarına maruz bıraktıktan sonra 2,0 µL yükleme tamponu eklenerek %1,5'lik agaroz jele yüklenmiştir. Işık kaynağı olarak oda sıcaklığında 302 nm dalga boyunda ve 8000 µW/cm² yoğunlukta ışık üreten UV translüminatör cihazı kullanılmıştır. Bu test sisteminde kontrol olarak, UV ve H₂O₂ uygulaması yapılmamış pBR322 plazmit DNA'sı kullanılmıştır (Takım, 2010; Berk, 2012). UV ışığına maruz bırakılarak ortamda bulunan H₂O₂'nin OH radikale parçalanması ve plazmit DNA'da hasar oluşturması ve bitki ekstraktlarının koruyucu özelliğinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

3.2.4.5.3. Agaroz jelin hazırlanması ve görüntülenmesi

Agaroz jelin hazırlanması aşamasında aşağıdaki prosedür uygulandı:

1. Elektroforez cihazına ait plastik plaka ile bir kalıp oluşturulur ve plaka yatay konumda, düzgün bir yere yerleştirilir. Örnek sayısına uygun olacak şekilde tarak plastiği yerleştirilir.

2. Agaroz (1,5 g), 250 mL'lik bir erlen içerisinde bulunan 100 mL 1x Tris Borik asit EDTA (TBE) tamponuna ilave edilir ve erlen agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında tutulur.
3. Agaroz çözeltisi daha sonra 50-60 °C'ye kadar soğutulur. Daha sonra 1,5 µL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edilir ve karıştırılır.
4. Agaroz çözeltisi, tarak yerleştirilmiş plastik plakaya dökülür.
5. Jelin polimerleşmesi için oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletilir. Jel donduktan sonra taraklar ve plakanın kenarlarındaki kalıp aparatları dikkatle çıkarılır.
6. Donmuş katılaşmış olan jel, elektroforez tankı içine uygun yönde yerleştirilir ve tankın içerisi maksimum çizgisine erişinceye kadar 1x TBE tamponu ile doldurulur.

Örneklerin agaroz jele yüklenmesi, jelin yürütülmesi ve görüntülenmesi aşamalarında aşağıdaki prosedür uygulandı:

1. UV' den çıkarılan eppendorf tüplerine 5 µL yükleme tamponu (6x loading dye) ilave edildi.
2. Tarak aparatının çıkarılmasıyla oluşan jelin kuyucuklarının elektroforez tamponu ile iyice temas etmesi, doldurulması sağlanır. Bu işlem sırasında jelin üzerini kaplayacak şekilde 1x TBE tamponu olmasına dikkat edilmelidir.
3. Hazırlanan DNA örnekleri uygun bir pipet ile tampon dolu kuyucuklara dikkatlice yüklendi.
4. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. DNA katottan (siyah uçtan) anoda (kırmızı uca) doğru hareket eder. DNA molekülünün yükü taşıdığı fosfat gruplarından dolayı negatif (-) olduğu için uygulanan elektrik alanında pozitif kutba (+) doğru hareket edecektir. Elektroforez 40 V'ta 500 mA akım uygulanarak 3 saat süreyle yürütüldü.
5. Elektrik akımı kesildi, elektroforezin kapağı çıkarıldı.

Agaroz jel, fotoğrafını çekerek, DNA bantlarının incelenmesi amacıyla UV transilluminatör cihazı üzerine alındı. Burada jele, alttan ultraviyole ışık verilerek, etidyum bromidin bağlandığı DNA fragmentlerinin gözle görülmesi sağlandı. Etidyum bromid kimyasalı toksik ve kanserojen bir kimyasal olup genetik materyal olan DNA'nın çift zincirli bağları arasına girerek sıkıca bağlanma özelliği göstermektedir. Etidyum bromid floresan bir madde olup ultra viyole (UV) ışık altında ışıma yaparak görünmektedir. Bu basamakta DNA fragmentlerinin arasına etidyum bromid kimyasalı

girerek bağlandığı için UV ışıktta incelendiğinde jel üzerindeki DNA'ların da görülmesi sağlanmış olur. Daha sonra jelin fotoğrafı jel görüntüleme sistemi ile çekildi.

DNA bantlarının jelde verdikleri ışımaların yoğunluğuna göre, kuyucuklara yüklenmiş DNA'ların bantlara göre yüzdesi jel görüntüleme sistemi (Gel Doc, BioRad) üzerinden algoritmaların optimize edilmesiyle hesaplandı (Kavsaoğlu ve Özkara, 2021; Lazar, 2021; Özkara, 2019; Pavel an Vasile, 2012; Horgan ve Glasbey, 1995).

3.2.4.6. İstatistiksel değerlendirme

Verilerin analizinde SPSS 23.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, Amerika Birleşik Devletleri) programı kullanıldı. İki grubu karşılaştırmak için Independent-Samples T testi kullanılırken, ikiden fazla grubu birbiriyle karşılaştırmak için One-Way Anova testi; Post Hoc analizleri için LSD, Dunnett ve Games Howell testleri kullanıldı. Parametrik olmayan koşullardan Kruskal-Wallis Testi tekniği kullanılmıştır. IC₅₀ değerleri Graphpad programı kullanılarak hesaplandı. Nicel veriler ortalama $\pm$ S.D. (standart sapma) değerler tablolarda ifade edilmiştir. Kategorik veriler n (sayı) ve yüzde (%) olarak ifade edildi. Veriler %95 güven düzeyinde analiz edildi ve p değeri 0,05'ten küçükse anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tez çalışmamızda öncelikle aronya meyvelerinin metanol, %70 etanol, etanol, etil asetat, hekzan ve su ekstraksiyonları hazırlanmış, çalışmanın amacına uygun olarak tüm analitik ve biyolojik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. Ekstraksiyon

Farklı çözücülerle hazırlanan ekstrelerin verim hesapları kuru bitki üzerinden % olarak hesaplanmıştır. Meyveye ait ekstraksiyon verimleri %68,6 g ve %1,25 g arasında değişmektedir. En yüksek verimin metanollü çözücü ile en düşük verimin ise hekzanlı çözücü olduğu görülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *Aronia melanocarpa* meyvelerinin farklı çözücülerle hazırlanmış ekstre verimleri

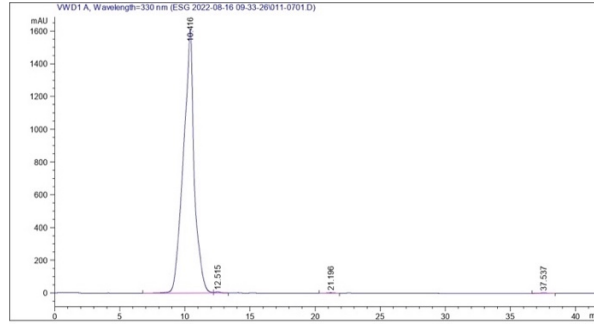
Ekstre	% Ekstraksiyon verimi
Metanol	%68,6
%70 Etanol	%36,84
Etanol	%5,72
Etil asetat	%2,15
Hekzan	%1,25
Su	%30,85

4.2. Analitik çalışmalar

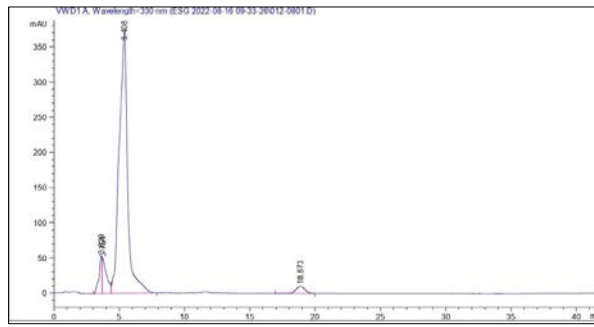
4.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sonuçları

4.2.1.1. Fenolik bileşiklerin HPLC analizi sonuçları

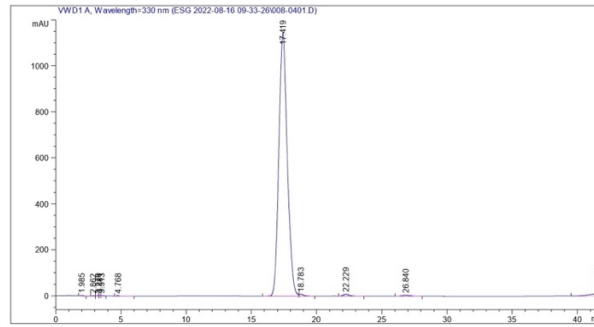
Çalışılan 6 farklı ekstrenin HPLC analizi sonuçlarına göre; metanol, %70 etanol, etanol ve etil asetat ekstrelerinde referans olarak analiz edilen standart fenolik bileşikler (Ferulik asit, kafeik asit, kersetin, kersetin-3- galaktozit, *p*-kumarik asit) (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.) tespit edilmiştir (Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.). Fenolik bileşiklerce en zengin ekstrenin etil asetat ekstresi olduğu ortaya konulmuş ve Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.



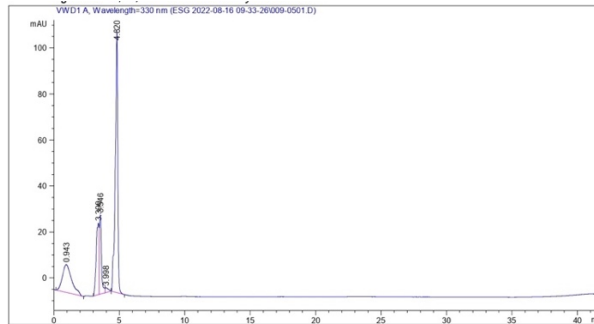
Şekil 4.1. Ferulik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 10.416)



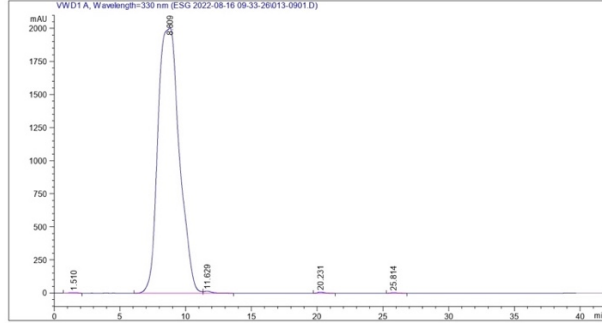
Şekil 4.2. Kafeik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 5.408)



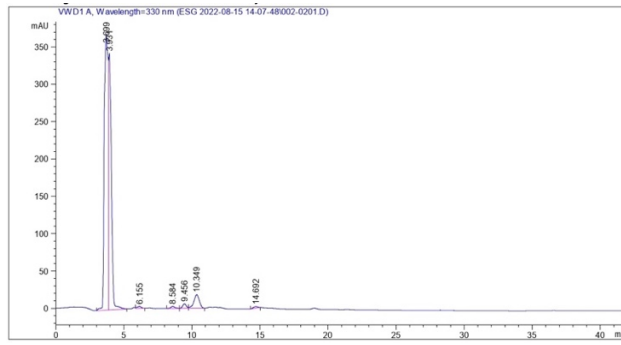
Şekil 4.3. Kersetin HPLC kromatogramı (R.T.: 17.419)



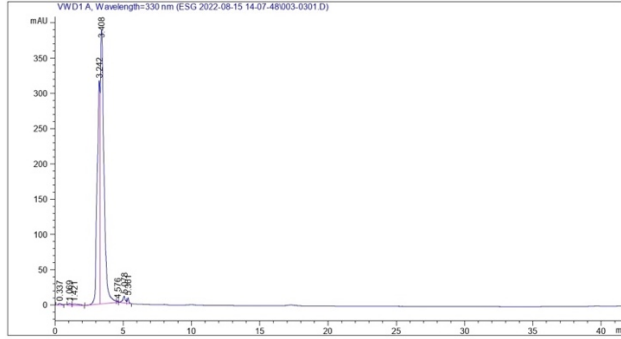
Şekil 4.4. Kersetin-3-galaktozit HPLC kromatogramı (R.T.: 4.620)



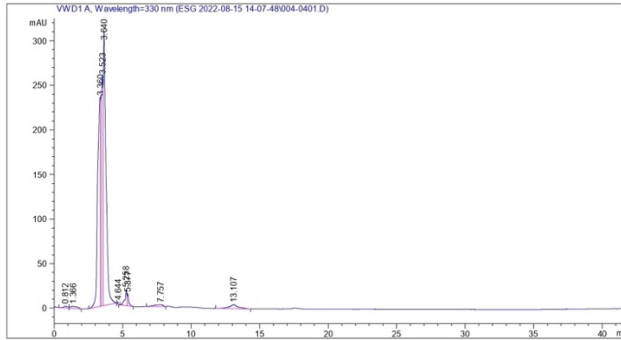
Şekil 4.5. *p*-Kumarik asit HPLC kromatogramı (R.T.: 8.809)



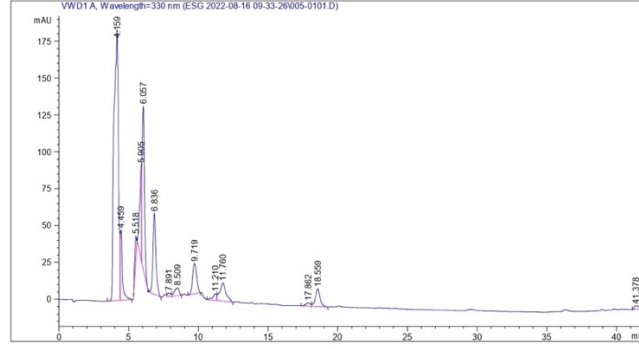
Şekil 4.6. Metanol ekstresi HPLC kromatogramı (*p*-kumarik asit R.T.: 8.594; Ferulik asit R.T.: 10.349)



Şekil 4.7. %70'lik etanol ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.576; kafeik asit R.T.: 5.381)



Şekil 4.8. Etanol ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.644; kafeik asit R.T.: 5.371)



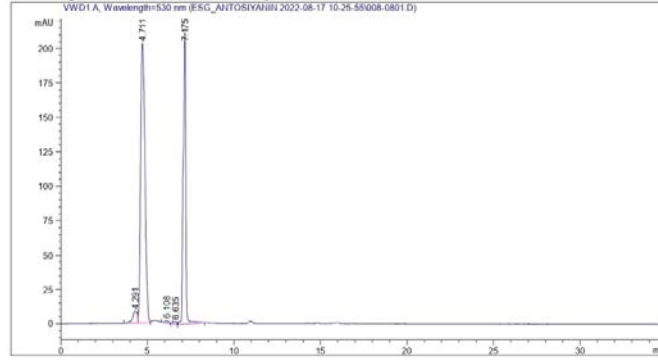
Şekil 4.9. Etil asetat ekstresi HPLC kromatogramı (kersetin-3-galaktozit R.T.:4.644; kafeik asit R.T.: 5.371; p-kumarik asit R.T.:8.509; kersetin R.T.:17.862)

Tablo 4.2. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının fenolik bileşikleri (R.T.: Retention time)

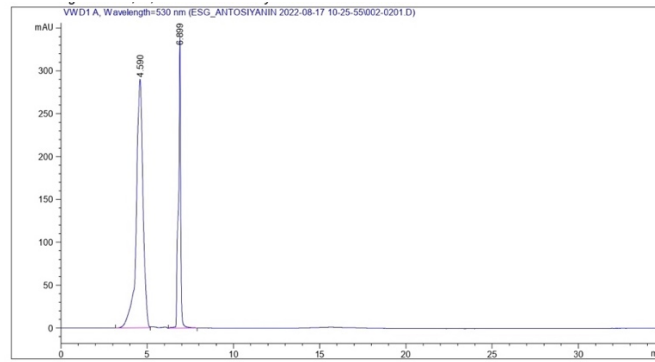
Ekstre	Ferulik asit R.T.: 10.416	Kafeik asit R.T.: 5.408	Kersetin R.T.: 17.419	Kersetin-3- galaktozit R.T.: 4.620	p-Kumarik asit R.T.: 8.809
Metanol	10.349	-	-	-	8.594
%70 Etanol	-	5.381	-	4.576	-
Etanol	-	5.371	-	4.644	-
Etil asetat	-	5.371	17.862	4.644	8.509
Hekzan	-	-	-	-	-
Su	-	-	-	-	-

4.2.1.2. Antosiyanin bileşiklerinin HPLC analizi sonuçları

Deneyler için hazırlanan 6 farklı ekstrenin HPLC analizi sonuçlarına göre; elimizdeki mevcut standart antosiyanin bileşiklerinin (malvin ve malvidin-3-o-glukozit) referans olarak analizi yapılmış ve 6 farklı ekstreten sadece metanol ekstresinde malvin bileşiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10., Şekil 4.11.). Ancak eldeki sonuçlara göre %70 etanol, etanol ve su ekstralarının de farklı antosiyanin bileşikleri içerdiği görülmüştür.



Şekil 4.10. Antosiyenin standart karışımı HPLC kromatogramı (malvin R.T.: 4.711; malvidin-3-o-glukozit R.T.:7.175) (R.T.: Retention time)



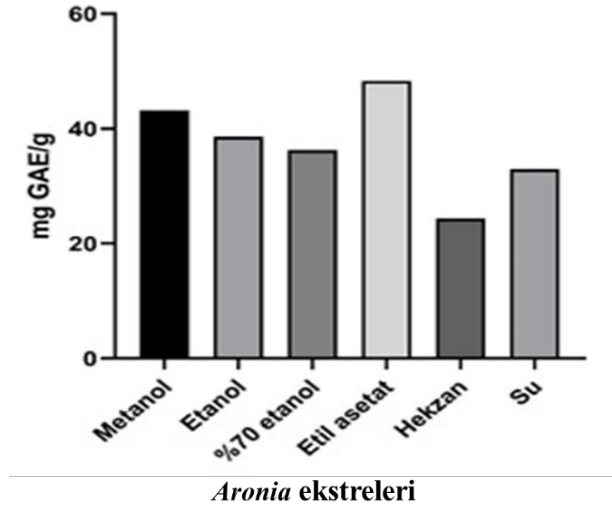
Şekil 4.11. Metanol ekstresi HPLC kromatogramı (malvin R.T.: 4.590) (R.T.: Retention time)

4.2.2. Toplam fenolik madde miktar tayini sonuçları

Aronya meyve ekstralarının toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu's metodu ile belirlenmiş ve gallik asit eş değeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek toplam fenolik madde içeren ekstrenin etil asetat ekstresi ($48,28 \pm 15,5$ mg GAE/g), en düşük toplam fenolik madde içeren ekstrenin ise hekzan ekstresi ($24,36 \pm 11,99$ mg GAE/g) olduğu gözlenmiş ve tüm ekstralara ait toplam fenolik madde miktarları Tablo 4.3.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Aronia melanocarpa meyve ekstralarının toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g ekstre)

Ekstre	Absorbans Değerleri	Toplam Fenolik Madde Miktarı
		(mg GAE/g ekstre)
Metanol	0,892	$43,19 \pm 5,48$
%70 Etanol	0,752	$36,24 \pm 3,20$
Etanol	0,800	$38,59 \pm 9,33$
Etil asetat	0,998	$48,28 \pm 5,51$
Hekzan	0,509	$24,36 \pm 1,99$
Su	0,685	$32,97 \pm 13,21$



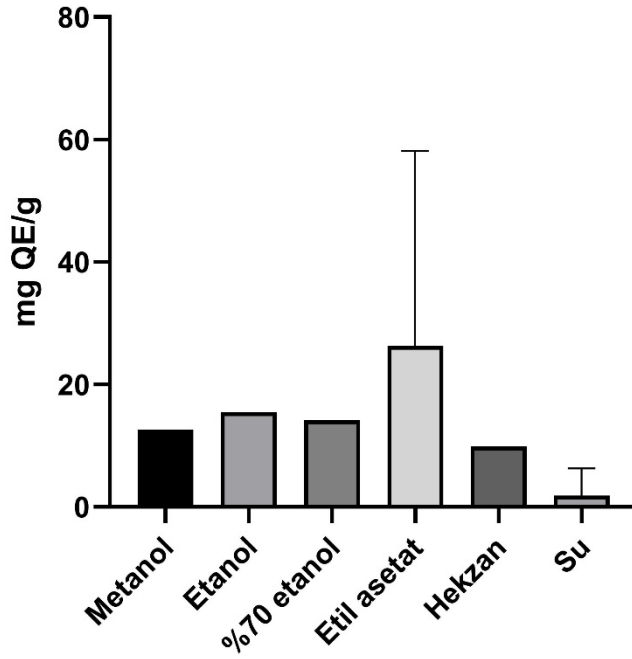
Şekil 4.12. Bitki ekstralarının gallik asite eşdeğer (mg GAE/g) toplam fenolik madde miktarı

4.2.3. Toplam flavonoit miktar tayini sonuçları

Aronya meyve ekstralarının toplam flavonoit içerik miktarı Alüminyum klorür (AlCl_3) kolorimetrik metodunun modifiye edilmesiyle tayin edilmiş (Aydın, 2021) ve kersetin eş değeri (QE) olarak ifade edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek toplam flavonoit madde içeren ekstrenin etil asetat ekstresi ($15,935 \pm 0,158$ miktarı mg QE/g), en düşük toplam flavonoit madde içeren ekstrenin ise hekzan ekstresi ($9,832 \pm 0,111$ mg QE/g) olduğu gözlenmiş ve tüm ekstralara ait toplam flavonoit madde miktarları Tablo 4.4. ve Şekil 4.13.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.4. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının toplam flavonoit madde miktarı (mg QE/g ekstre)

Ekstre	Absorbans Değerleri	Toplam Flavonoit Madde Miktarı
		(mg QE/g ekstre)
Metanol	0,495	$12,585 \pm 0,145$
%70 Etanol	0,552	$14,137 \pm 0,158$
Etanol	0,600	$15,445 \pm 0,169$
Etil asetat	0,618	$15,935 \pm 0,158$
Hekzan	0,394	$9,832 \pm 0,111$
Su	0,455	$11,496 \pm 0,213$



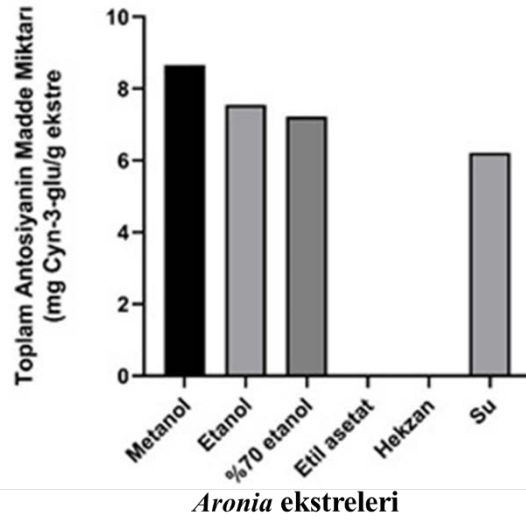
Şekil 4.13. Bitki ekstralarının kersetine eşdeğer (mg/g) toplam flavonoit miktarları

4.2.4. Toplam antosiyanin miktar tayini sonuçları

Aronya meyve ekstralarının toplam antosiyanin madde miktarı pH diferansiyel metodu ile belirlenmiş ve siyanidin-3-glukozit eş değeri (Cyn-3-glu) olarak ifade edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek toplam antosiyanin madde içeren ekstrenin metanol ekstresi ($8,649 \pm 0,192$ mg Cyn-3-glu/g), en düşük toplam antosiyanin madde içeren ekstrenin su ekstresi ($6,221 \pm 0,158$ mg Cyn-3-glu/g) olduğu gözlenmiş, etil asetat ve hekzan ekstraları için ise absorbans belirlenememiştir. Tüm ekstralara ait toplam antosiyanin madde miktarları Tablo 4.5. ve Şekil 4.14.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.5. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının toplam antosiyanin madde miktarı (mg Cyn-3-glu/g ekstre)

Ekstre	Absorbans Değerleri	Toplam Antosiyanin Madde Miktarı (mg Cyn-3-glu/g ekstre)
Metanol	51,799	$8,649 \pm 0,192$
%70 Etanol	43,245	$7,221 \pm 0,127$
Etanol	45,208	$7,549 \pm 0,153$
Etil asetat	<0,001	<0,2 Belirlenmedi
Hekzan	<0,001	<0,2 Belirlenmedi
Su	37,25	$6,221 \pm 0,158$



Şekil 4.14. *Aronia melanocarpa* meyve ekstraktlarının toplam antosiyanin madde miktarı (mg Cyn-3-glu/g ekstre)

4.3. Biyolojik Aktivite Sonuçları

4.3.1. Antioksidan aktivite sonuçları

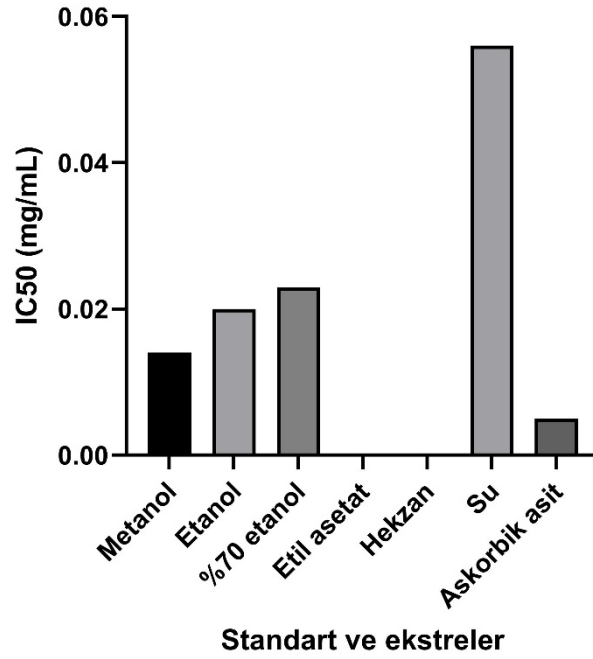
4.3.1.1. DPPH• yöntemi aktivite sonuçları

Bu yöntem ile *Aronia melanocarpa* meyvelerinin 6 farklı çözücü ile hazırlanmış ekstraktlarının ardışık seyreltme yoluyla farklı derişimlerdeki örneklerinin DPPH• çözeltilisinin rengini açma kapasiteleri, % inhibisyon olarak belirlenmiştir. Tablo 4.6. ve Şekil 4.15.'te görüldüğü üzere antioksidan kapasitesi yüksek örnekler metanol, etanol ve %70 etanol ekstraktlarıdır.

Sonuçlar incelendiğinde; DPPH• yöntemine göre serbest radikalleri inhibe etme özelliğinin en yüksek olduğu ekstre metanol, en düşük olduğu ekstraktların ise hekzan ve etil asetat ekstresi olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. *Aronia melanocarpa* meyve ekstraktlarının serbest radikal üzerinden hesaplanan inhibe değerleri

Ekstreler/Standart Çözelti	IC ₅₀ (mg/mL)
Metanol	0,014 ± 0,001
%70 Etanol	0,023 ± 0,002
Etanol	0,020 ± 0,004
Etil asetat	>10
Hekzan	>10
Su	0,056 ± 0,006
Askorbik asit	0,005 ± 0,001



Şekil 4.15. *Aronia melanocarpa* meyve ekstrlerinin antioksidan kapasitelerinin DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri

4.3.1.2. ABTS^{•+} yöntemi aktivite sonuçları

Aronya ekstrlerinin ABTS^{•+} serbest radikalini süpürme etkisi troloksun etkisine eşdeğer olarak spektrofotometrik yöntemle bulunmuştur. Numunelerin antioksidan etkileri troloksun (standart madde) ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ile karşılaştırılarak saptanmıştır. TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) değerinin tayininde troloks standart antioksidanının ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ölçülerek standart çalışma grafiği çizilmiştir. Süpürme etkisi % İnhibisyon olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

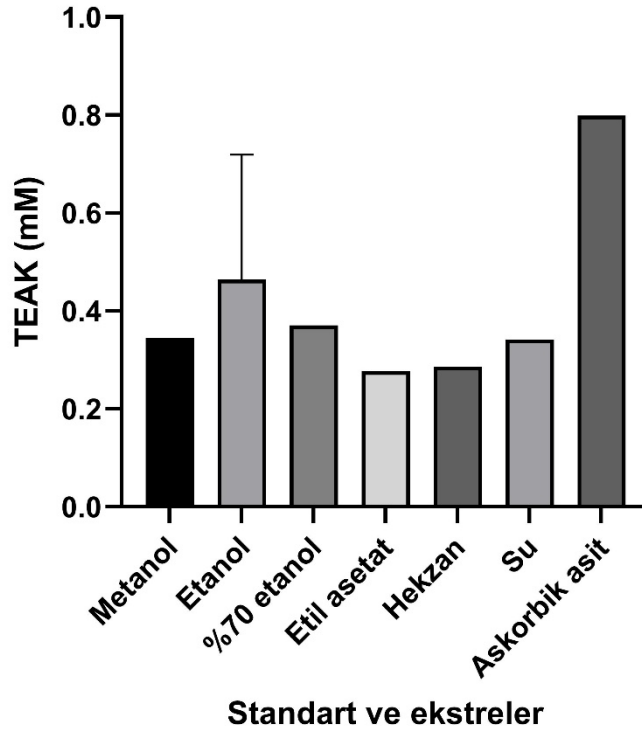
$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_6 - A_1) / A_1] \times 100$$

Bitki ekstrleri ile de benzer ölçümler yapıldığında elde edilen grafiklerin eğimleri belirlenerek, standart grafiğin eğimine oranlanarak örneklerin troloks eşdeğeri antioksidan aktivitesi (TEAC) hesaplanmıştır (Tablo 4.7.) (Gliszczynska-Swiglo, 2006; Ardağ, 2008).

Tablo 4.7. Standart antioksidanlar ve bitki ekstreleri için ABTS^{•+} radikali süpürme aktivite değerleri (Bitki Numunesinin veya standartın doğru denkleminin eğimi/Troloks grafiğinin doğru denkleminin eğimi)

Ekstreler/Standart Maddeler	TEAC ABTS ^{•+} katyon radikalini
	süpürme değerleri (mM)
Metanol	0,345 ± 0,011
%70 Etanol	0,371 ± 0,022
Etanol	0,381 ± 0,034
Etil asetat	0,277 ± 0,018
Hekzan	0,286 ± 0,020
Su	0,342 ± 0,026
Askorbik asit (Cvit)	0,799 ± 0,028
Troloks	1

Sonuç itibariyle; standart olarak kullanılan diğer madde C vitamini olup eşdeğer miktardaki troloksun yaklaşık 0,799 katıdır. Bitki ekstrelerinde eşdeğer miktardaki troloks antioksidanına göre, çözücü farklılığı hesaplamalarda önemli bir farka neden olmamıştır (Tablo 4.7. ve Şekil 4.16.). Radikal süpürme aktivitesinin aronya bitkisinin etanol, %70 etanol ve metanol ekstrelerinde daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak bitkinin tüm ekstrelerinin ABTS^{•+} süpürme aktivitelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Diğer taraftan Tablo 4.7.'den görüldüğü üzere aronya bitkisinin meyvelerinin etanol ekstresi eş değer miktardaki standart antioksidan olarak alınan troloksun yaklaşık 0,381'i kadar antioksidan aktivite göstermektedir. Su ekstresi için bu değer yaklaşık 0,342'dir. Sonuç olarak; en yüksek TEAC aktivitesi 0,381 değeri ile aronya bitkisi meyvelerinin etanol ekstresinden, en düşük TEAC aktivitesi 0,277 değeri ile aronya bitkisi meyvelerinin etil asetat ekstresinden elde edilmiştir (Tablo 4.7. ve Şekil 4.16.).



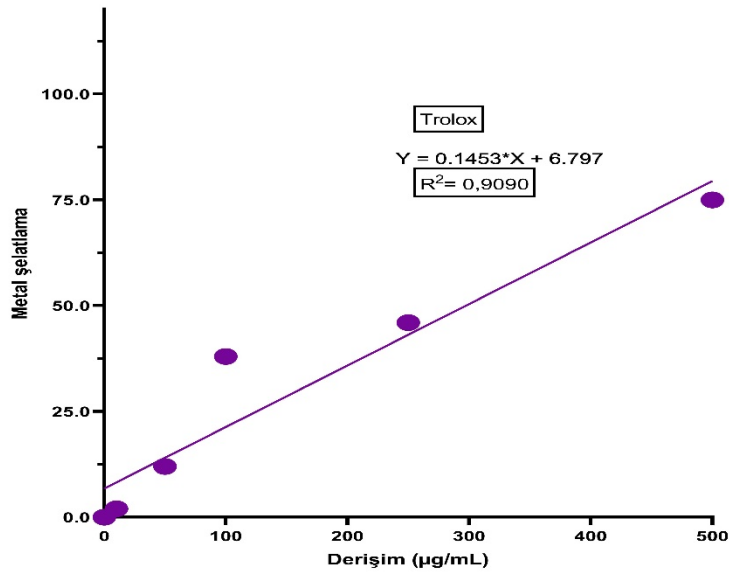
Şekil 4.16. Aronia meyve ekstrlerinin troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri

4.3.1.3. Metal şelatlama yöntemi aktivite sonuçları

Metal şelatlama aktivitesi lipit peroksidasyonuna sebep olan metalleri tuttuğundan dolayı önemlidir (Kandepu, 1999). Lipit peroksidasyonuna sebep olan radikaller, zararlı protein modifikasyonlarına ve DNA hasarlarına sebep olabilmektedir. Şelatlama yapabilen reaktifler, sekonder antioksidan moleküller olarak belirlenmiştir ve bunlar redoks potansiyelini düşürmektedirler. Bu yüzden metal iyonlarının oksitlenmiş formlarını stabilize ederler. Ferrozin molekülü Fe^{2+} molekülüyle miktarsal olarak tayin edilebilecek kompleksler oluşturabilmektedir (Gültekin ve Öztürk, 2020; Daştan, 2017). Kompleks oluşumu, ortamda şelatlama ajanının bulunması durumunda engellenir ve bu da kompleksin belirteci olan kırmızı rengin miktarında azalma meydana getirir. Bu yüzden kırmızı renkli kompleksin azalmasının ölçülmesiyle şelatör ajanın, şelatlama aktivitesi hesaplanmaktadır (Shawmi ve Parhangi, 1980; Daştan, 2017; Parlak ve Koparır, 2018).

Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde, aronya bitkisi meyve ekstrlerinin veya standart antioksidanların varlığında ferrozin- Fe^{+2} kompleksi, tam olarak oluşmamaktadır. Bu durum çalışmamız kapsamında incelediğimiz aronya bitkisi

ekstrelerinin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir. Metal şelatlama aktivitesi, her bir bitki ekstresi için 50-500 µg/mL olmak üzere farklı derişimlerde hazırlanmış içeriklerle değerlendirilmiştir. Aynı zamanda ekstrelerle aynı konsantrasyonda hazırlanmış standart antioksidan olarak kabul edilen troloks referans olarak kullanılmıştır. Tüm örneklerin 562 nm’de absorbansları alınmış ve tutulan metalin yüzdesi hesaplanmıştır. Bu metotta, düşük absorbans değeri hesaplama sonucunda yüksek aktivite yüzdesine karşılık gelmektedir. Sonuçlar Tablo 4.8. ve Şekil 4.18.’de sunulmuş, troloks standartı için ise standart eğrisi Şekil 4.17.’de verilmiştir.

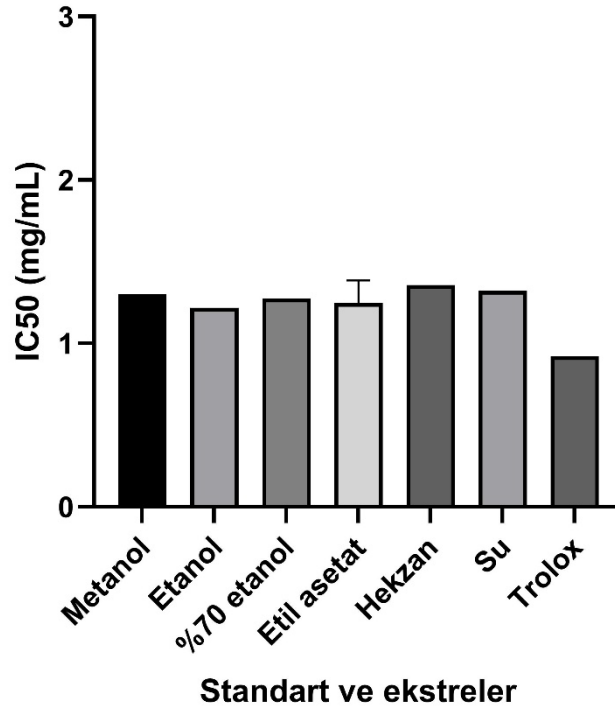


Şekil 4.17. Troloks için standart eğri grafiği

Çalışmada kullanılan bitki ekstrelerinin konsantrasyon miktarı arttıkça metal iyonlarını şelatlama aktivitesinde yükselme olduğu görülmüştür. İşleme tabii tutulan bitki ekstrelerinin % şelatlama oranları hesaplanmış ve IC₅₀ değerleri bu veriler ışığında belirlenmiştir. Denediğimiz tüm bitki ekstreleri içerisinde aronya bitkisi etanol ekstrelerinin metal şelatlama aktivitesinin diğerlerine göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Diğer bitki ekstreleri ve kullandığımız standart çözeltilerinin metal şelatlama kapasitelerine göre sıralanmaları şu şekildedir; Troloks>Etanol ekstresi>%70 Etanol ekstresi>Etil asetat ekstresi>Metanol ekstresi>Su ekstresi>Hekzan ekstresi (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. Çalışmada kullanılan standart ve bitki ekstralarının metal şelatlama aktiviteleri

Ekstreler/ Standart madde	Metal Şelatlama Aktivitesi IC ₅₀ değerleri (mg/mL)
Metanol	1.301 mg/mL
%70 Etanol	1.275 mg/mL
Etanol	1.218 mg/mL
Etil asetat	1.293 mg/mL
Hekzan	1.358 mg/mL
Su	1.322 mg/mL
Troloks	0.921 mg/mL



Şekil 4.18. Aronia melanocarpa meyve ekstralarının metal şelatlama kapasiteleri

4.3.1.4. CUPRAC yöntemi aktivite sonuçları

CUPRAC yöntemi ile *Aronia melanocarpa* meyvelerinin 6 farklı çözücü ile hazırlanmış ekstralarının ve standart antioksidanların konsantrasyona karşı absorbans grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimleri oranlandı. Bu çalışmada troloks için elde edilen grafik şekli materyal metod kısmında verilmiş ve Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

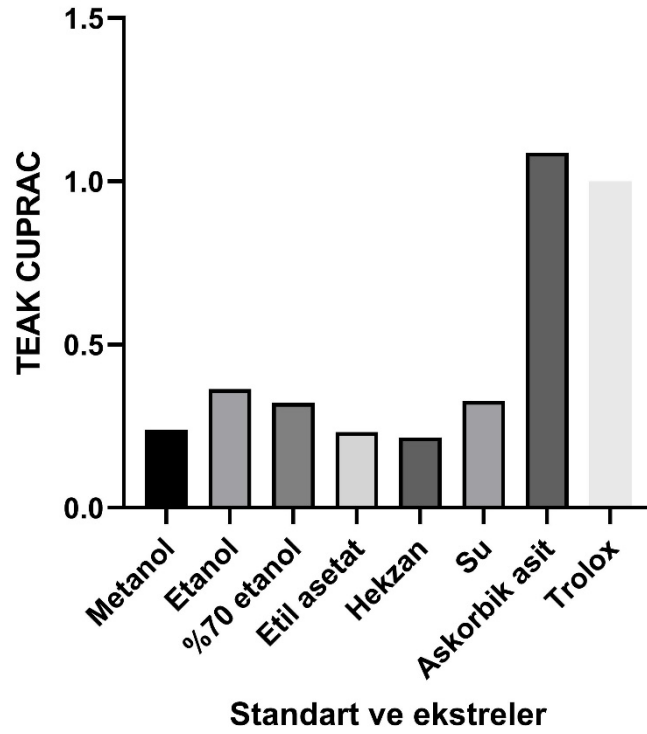
Bitki ekstralarının ve standart antioksidanların derişimine karşı CUPRAC yöntemi ile verdikleri absorbans sonuçlarından elde edilen grafiklerde, doğru denklemlerinin eğimleri ile hesaplama yapıldı. Grafikteki her bir doğrunun eğimi troloks için elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlanmış ve TEAC_{CUPRAC} değerleri elde edilmiştir

(Tablo 4.9. ve Şekil 4.19.). Her bir standart ve bitki ekstresi için $TEAC_{CUPRAC}$ değerleri aşağıdaki eşitlikten bulunmuştur.

$TEAC_{CUPRAC}$ değerleri = Bitki numunesinin veya standartın doğru denkleminin eğimi/Troloks grafiğinin doğru denkleminin eğimi

Tablo 4.9. Standart antioksidanlar ve bitki ekstreleri için $TEAC_{CUPRAC}$ değerleri

Ekstreler/ Standart madde	Eğim	$TEAC_{CUPRAC}$ değerleri
Metanol	0,001426	0,239
%70 Etanol	0,001910	0,321
Etanol	0,002166	0,363
Etil asetat	0,001385	0,232
Hekzan	0,001283	0,215
Su	0,001948	0,327
C vitamini	0,006495	1,088
Troloks	0,005967	1



Şekil 4.19. Aronia meyve ekstrelerinin $TEAC_{CUPRAC}$ kapasiteleri

Standart olarak kullanılan C vitamini eşdeğer miktardaki troloksun yaklaşık 1,088 katıdır. Bitki ekstralarında eşdeğer miktardaki troloks antioksidanına göre, çözücü farklılığı hesaplamalarda önemli bir farka neden olmamıştır (Tablo 4.9. ve Şekil 4.19.). En fazla TEAC_{CUPRAC} aktivitesinin aronya bitkisinin etanol ve su ekstralarında olduğu görülmüştür. Ancak bitkinin tüm ekstralarının TEAC_{CUPRAC} aktivitelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Diğer taraftan Tablo 4.9.'da görüldüğü üzere aronya bitkisinin meyvelerinin etanol ekstresi eş değer miktardaki standart antioksidan olarak alınan troloksun yaklaşık 0,363'ü kadar antioksidan aktivite göstermektedir. Su ekstresi için bu değer yaklaşık 0,327'dir.

Sonuç olarak; en yüksek TEAC_{CUPRAC} aktivitesi 0,363 değeri ile aronya bitkisi meyvelerinin etanol ekstresinden, en düşük TEAC_{CUPRAC} aktivitesi ise 0,215 değeri ile aronya bitkisi meyvelerinin hekzan ekstresinden elde edilmiştir.

4.3.1.5. Lipid peroksidasyon yöntemi aktivite sonuçları

Aronia melanocarpa meyvelerinin 6 farklı çözücü ile hazırlanmış ekstralarının HUVEC ve L929 hücre hatlarına 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanması ile genel olarak kontrol grubuna göre hücrelerde MDA değerlerinde istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; diğer tüm ekstraların benzer değerlere sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. HUVEC ve L929 hücre hatlarında 100 µg/mL konsantrasyonda *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının uygulandığında MDA seviyeleri

Ekstreler	HUVEC hücre hattı MDA seviyesi	L929 hücre hattı MDA seviyesi
Metanol	4,02±0,19	2,63±0,17
%70 Etanol	4,15±0,15	2,59±0,14
Etanol	4,07±0,29	2,75±0,18
Etil asetat	4,08±0,16	2,80±0,19
Hekzan	4,10±0,15	2,67±0,15
Su	4,09±0,19	2,79±0,11
Kontrol grubu	3,96±0,16	2,68±0,15

4.3.2. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Aronia melanocarpa meyvelerinin 6 farklı çözücü ile hazırlanmış ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi Tablo 4.11.'de sunulmuştur. MİK değerleri ≤ 0.1 mg/mL

olduğunda madde önemli etkili; MİK değerleri $0.1 < \text{MİK} \leq 0.625$ mg/mL olduğunda orta etkili, MİK değeri > 0.625 mg/mL olanlar ise düşük etkili olarak sınıflandırılır (Kuete, 2010; Awouafack vd., 2013). Mevcut bulgular neticesinde; aronya meyve ekstralarının genel olarak bazı mikroorganizmalar üzerinde orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve etanolik ekstralarının diğer ekstralara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca çalışma sonucunda aronya meyve ekstralarının *B. cereus* mikroorganizması üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

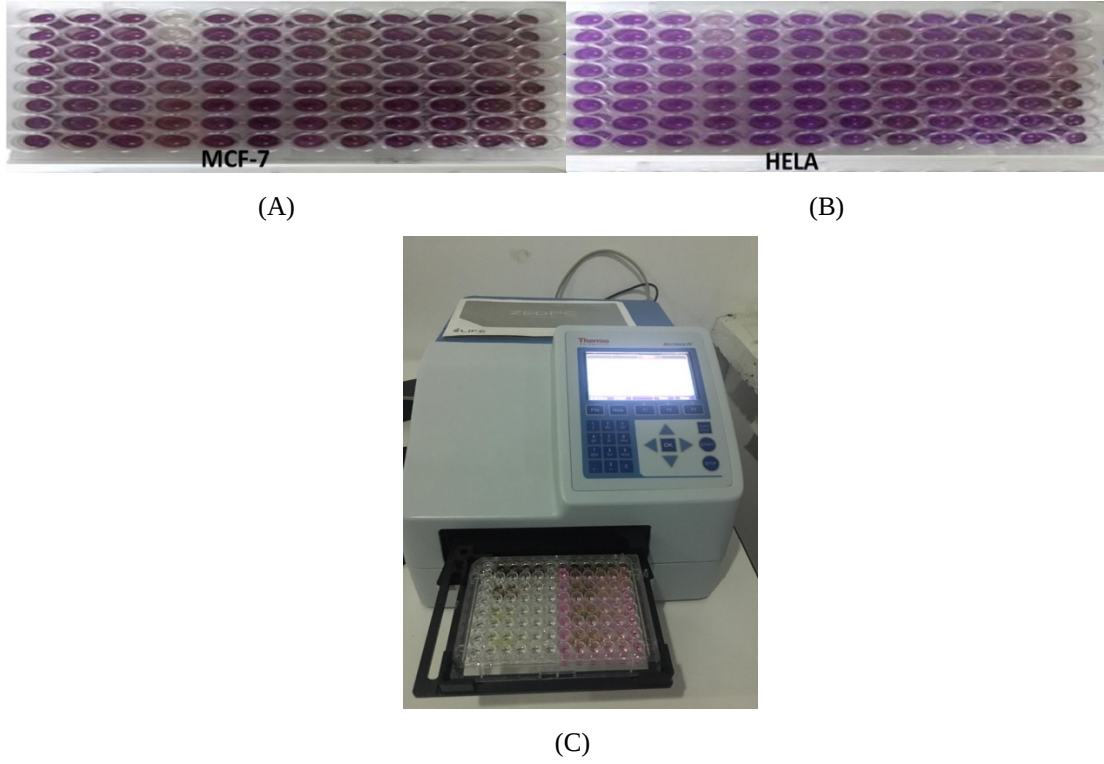
Tablo 4.11. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının antimikrobiyal aktivite sonuçları

Ekstreler	Mikroorganizmalar							
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. thurigiensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. kochii</i>	<i>C. albicans</i>
Metanol	0.625	0.313	0.313	>5	0.313	0.625	>5	0.313
%70 Etanol	0.625	0.157	0.313	>5	0.313	0.625	0.313	0.625
Etanol	0.313	0.157	0.157	>5	0.157	0.313	0.313	0.625
Etil asetat	2.5	1.25	>5	>5	2.5	>5	>5	1.25
Hekzan	1.25	0.625	2.5	>5	1.25	2.5	1.25	0.625
Su	0.313	0.313	0.313	>5	0.313	0.313	0.313	0.625

4.3.3. *In vitro* antitümör aktivite sonuçları

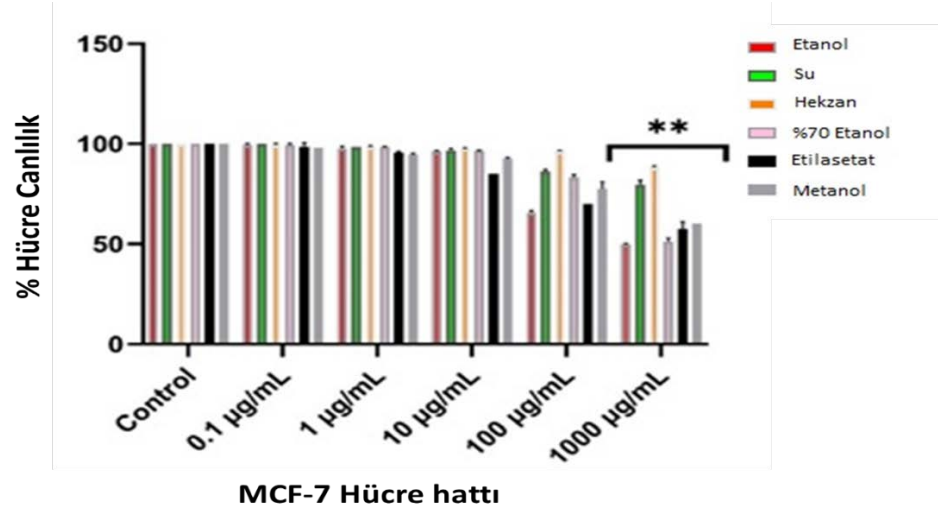
Aronya meyvesinden 6 farklı çözücü ile elde edilmiş ekstraların 0,1 µg/mL ile 1000 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda, iki farklı kanser hücre hattı üzerinde (MCF-7 ve HeLa) uygulama yapılmış, 24 saatlik inkübasyondan sonra sitotoksik aktiviteleri MTT testi kullanılarak incelenmiştir. MTT testi sonucunda 96 kuyucuklu plakların fotoğrafları çekilmiş (Görsel 4.1.) ve okumaları Elisa cihazında (Thermo) yapılmıştır. Ekstrelerin farklı hücre hatları üzerindeki etkilerini gösteren IC₅₀ değerleri Tablo 4.12.'de sunulmuş ve genel olarak özellikle 100 µg/mL konsantrasyonun üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; aronya meyvesine ait tüm ekstraların MCF-7 ve HeLa hücre hatları üzerinde orta düzeyde sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu, en yüksek sitotoksik aktivitenin ise etanol ekstresinde olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.12.). Aronya meyve ekstralarının HeLa hücre hattı üzerinde MCF-7 hücre hattına nazaran daha etkili olduğu, etanol ekstraları ile metanol ekstralarının diğerlerine göre bu hücreler üzerinde daha fazla hücre canlılığını azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.).

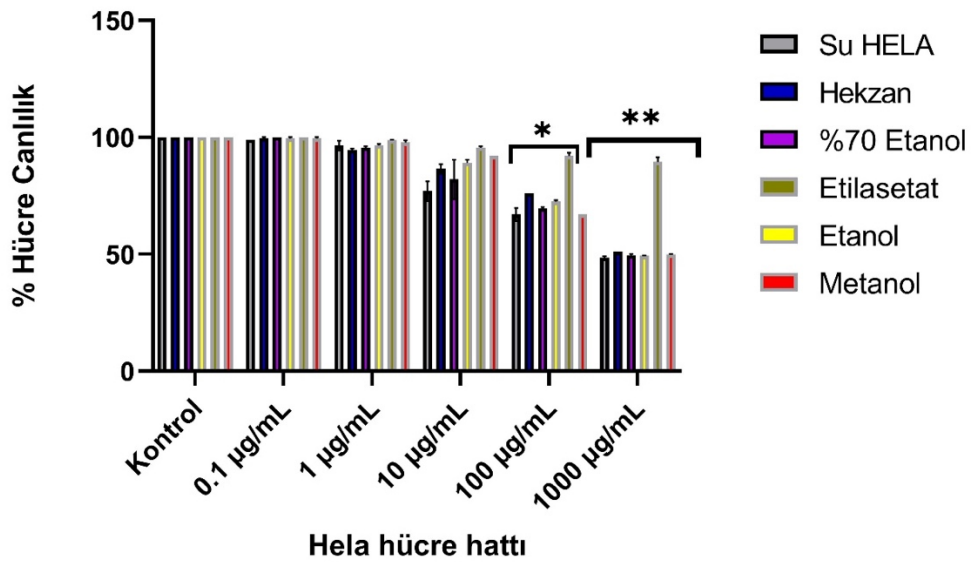


Görsel 4.1. (A) MCF-7 hücre hattında MTT reaksiyonu plate görünümü, (B) HeLa hücre hattında MTT reaksiyonu plate görünümü, (C) MTT reaksiyonu sonuçlarının Elisa cihazı okumalar

Ekstre	MCF-7	HeLa
	IC ₅₀ Değerleri µg/mL	IC ₅₀ Değerleri µg/mL
Metanol	268,42 ± 54,63	101,55 ± 24,27
%70 Etanol	237,18 ± 42,19	98,98 ± 28,31
Etanol	111,44 ± 39,67	95,14 ± 22,87
Etil asetat	259,50 ± 54,43	319,51 ± 88,25
Hekzan	661,80 ± 78,70	163,98 ± 73,48
Su	346,12 ± 84,56	116,12 ± 58,63



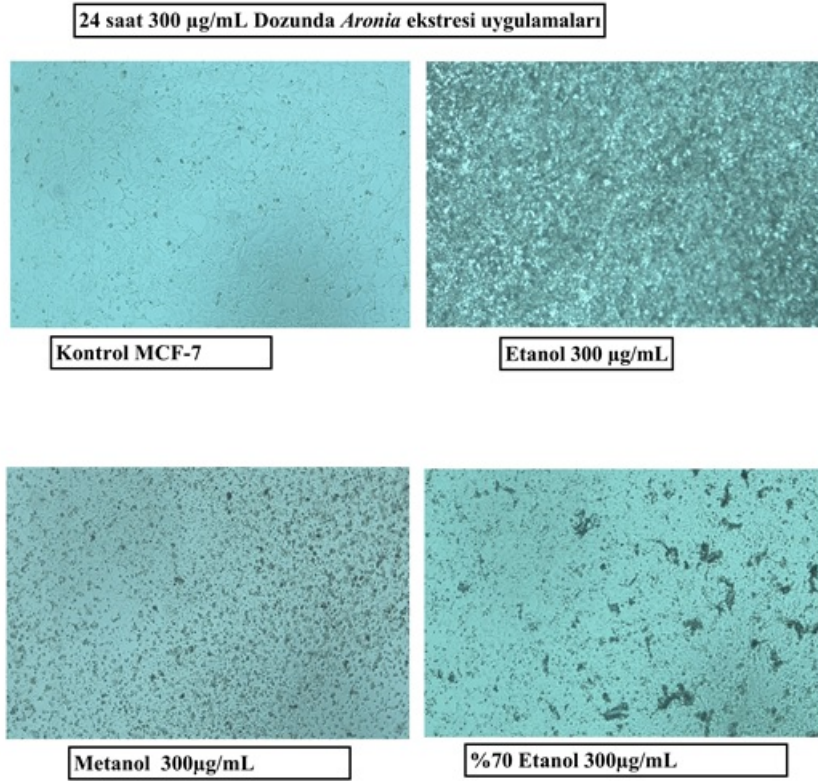
Şekil 4.20. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının MCF-7 hücre hattındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (** $p < 0.01$)



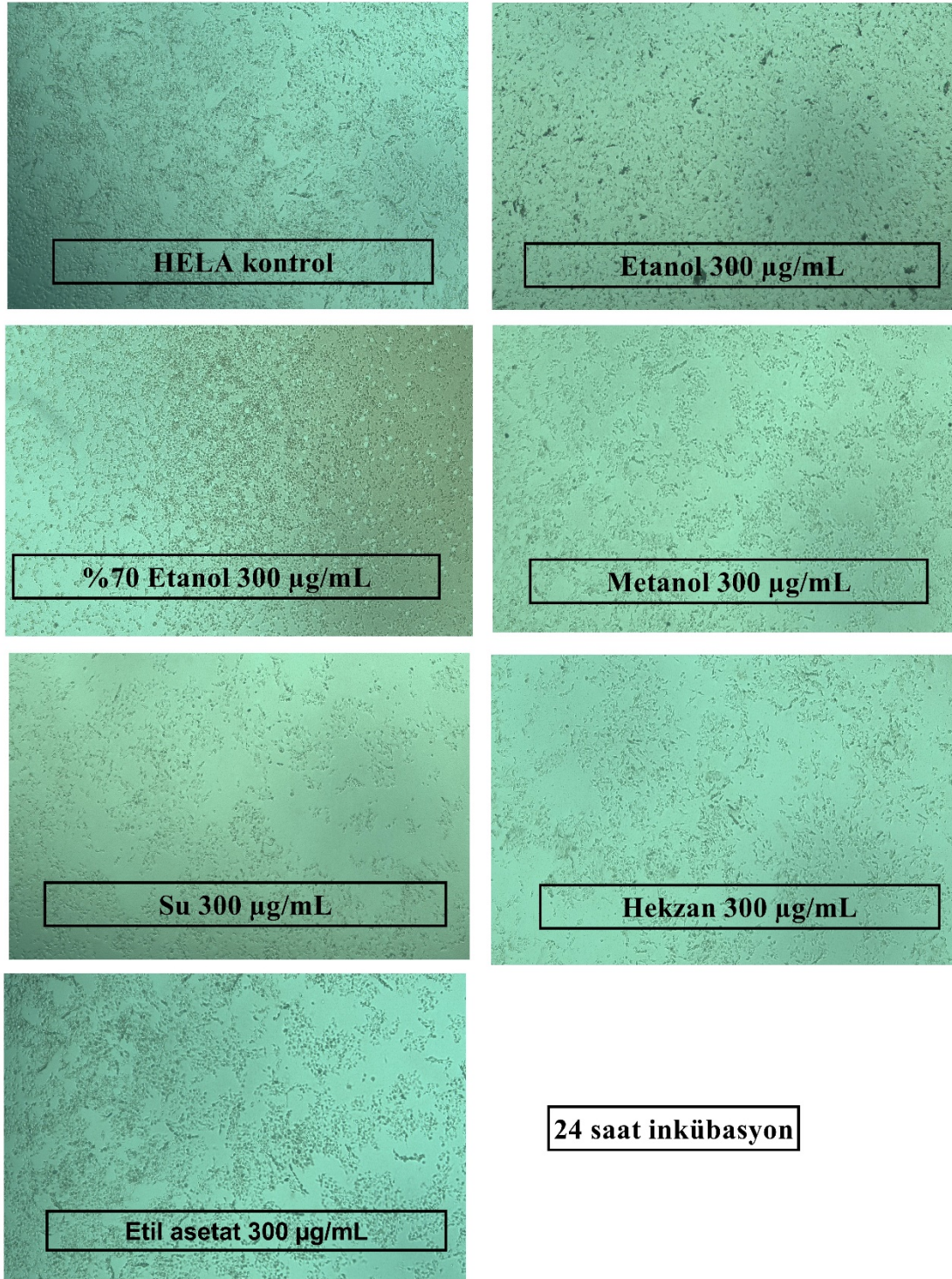
Şekil 4.21. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının HeLa hücre hattındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (** $p < 0.01$)

Aronya meyve ekstraları ile farklı dozlarda muamele edilmiş MCF-7 ve HeLa hücre hatlarının morfolojik görünüşleri, Zeiss Axio inverted mikroskop (10x) ile görüntülendi. MCF-7 hücre hattında aronya bitkisi ekstralarının genel olarak 100 µg/mL uygulama dozunun üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirlendiği için ($IC_{50} > 100$ µg/mL), tek standart doz olarak 300 µg/mL dozlu ekstralar 24 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve hücrelerdeki değişimlerin görüntülenmesi sağlanmıştır (Görsel 4.2.). Etanol ve metanol ekstralarının MCF-7 hücrelerinin morfolojisini değiştirdiği görülmüştür. HeLa hücre hattında aronya bitkisi meyvelerine ait 6 farklı ekstrenin 24

saat süresince 300 µg/mL uygulanması sonucu hücrelerin canlılığı üzerinde azaltıcı etkilerin görülmesiyle birlikte hücrelerin şekillerinin de değiştiği ve hücre bütünlüklerinin bozulmaya başladığı tespit edilmiştir (Görsel 4.2. ve Görsel 4.3.). Hücre hatlarındaki ekstrelerin IC₅₀ değerleri 100 µg/mL eşiğinin üzerinde olduğundan ileri antikanser analizleri yapılmamıştır. Morfolojik değişiklikler apoptotik hücre ölümünü gösterebilir. Ekstrelerden etkilenen hücreler normal yapışık hücre şeklini kaybeder ve birkaç saat içinde birbirinden ayrılmış yuvarlak hücrelere dönüşür. Bu tür ayrı hücreler, plaka yüzeyinden ayrılır. Bu gruplarda gözlenen hücrelerin ayrılması, şekil değiştirmeleri ve yuvarlak, kırışık bağımsız hücrelere dönüşmeleri apoptoz görünümü olarak kabul edilmiştir.



Görsel 4.2. Aronia ekstrelerinin MCF-7 hücre hattında 300 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu



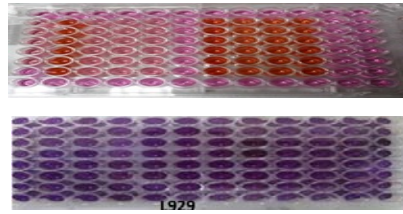
Görsel 4.3. Aronia ekstrelerinin HeLa hücre hattında 300 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu

4.3.4. *In vitro* sitotoksik aktivite sonuçları

Aronya meyvesinden 6 farklı çözücü ile elde edilmiş ekstrelerin 0,1 µg/mL ile 1000 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda, iki ayrı sağlıklı hücre hattı üzerinde (HUVEC ve L929) uygulama yapılmış, 24 saatlik inkübasyondan sonra sitotoksik

aktiviteleri MTT testi kullanılarak incelenmiştir. MTT reaksiyonu sonucunda 96 kuyucuklu plakların fotoğrafları çekilmiş (Görsel 4.4.) ve okumaları Elisa cihazında (Thermo) yapılmıştır. Ekstrelerin farklı hücre hatları üzerindeki etkilerini gösteren IC₅₀ değerleri Tablo 4.13.'te sunulmuştur.

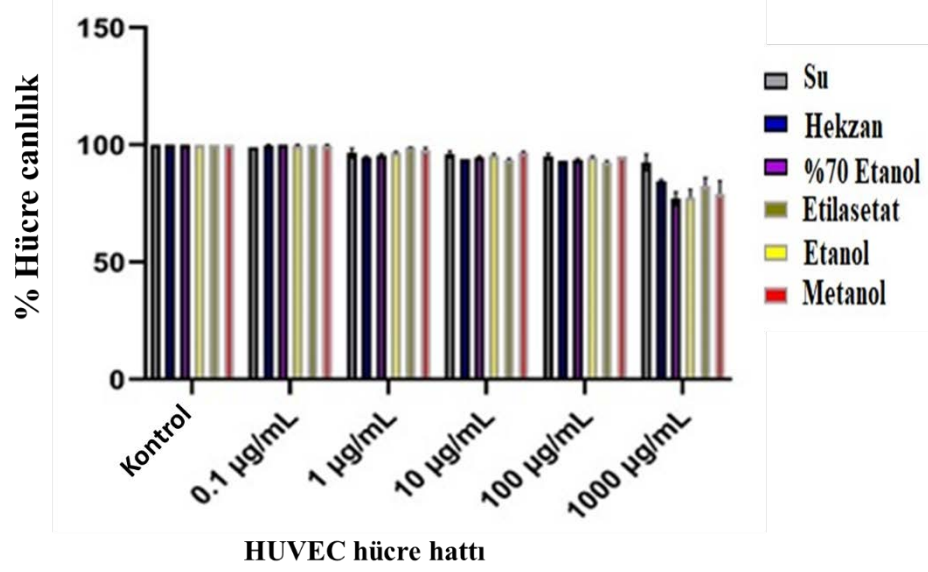
Her iki hücre hattında da kontrol grubu ile doz grupları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ($p>0.05$; Tablo 4.13.) Bu veriler ışığında aronya meyve ekstrelerinin sağlıklı hücre hatları HUVEC ve L929 üzerinde sitotoksik etkisi bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır.



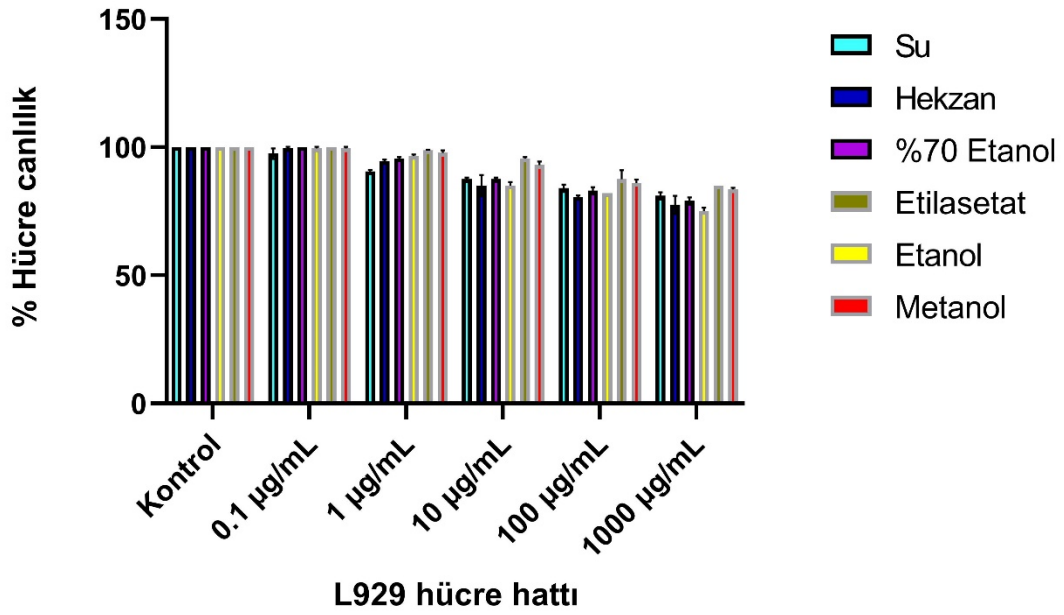
Görsel 4.4. HUVEC ve L929 hücre hatlarında MTT reaksiyonu plate görünümü

Tablo 4.13. Aronia melanocarpa meyve ekstrelerinin HUVEC ve L929 hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri ($p>0,05$)

Ekstre	HUVEC	L929
	IC ₅₀ değerleri µg/mL	IC ₅₀ değerleri µg/mL
Metanol	468,72± 79,11	501,22± 54,45
%70 Etanol	437,59± 51,49	497,18± 77,28
Etanol	411,25± 49,13	459,27± 85,46
Etil asetat	569,47± 74,16	521,55± 96,08
Hekzan	458,85± 78,27	663,27± 103,12
Su	463.27± 84,73	506,42± 114,13

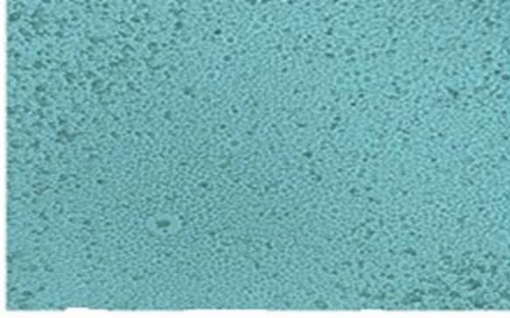


Şekil 4.22. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının HUVEC hücre hattındaki % hücre canlılık sonuçları

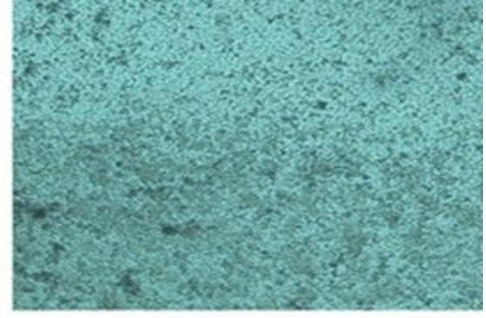


Şekil 4.23. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının L929 hücre hattındaki % hücre canlılık sonuçları

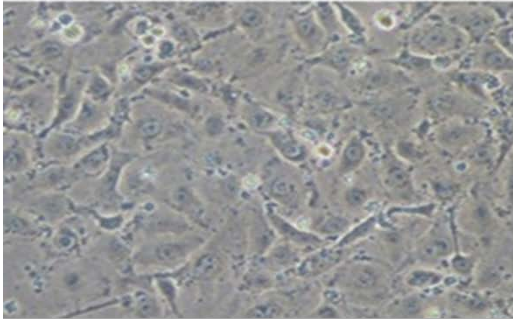
HUVEC ve L929 hücrelerinde aronya meyvesi ekstralarının 24 saat süresince uygulanması sonucunda elde edilen IC_{50} değerlerinin $>400 \mu\text{g/mL}$ olduğu görülmüştür (Tablo 4.13.). Yine HUVEC ve L929 hücrelerinin morfolojik yapıları ve büyümesi Zeiss Axio ters mikroskobu (10x) ile görüntülenmiş olup, bitki ekstralarının olumsuz bir etkisi belirlenmemiştir (Görsel 4.5.).



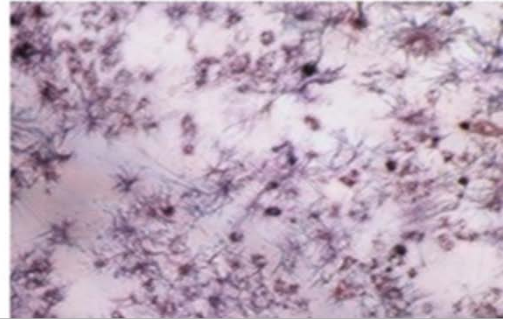
L929 Kontrol



L929 400 µg/mL



HUVEC Kontrol



HUVEC 400 µg/mL

Görsel 4.5. Aronia meyve ekstrelerinin HUVEC ve L929 hücre hattında 400 µg/mL dozunda 24 saat inkübasyon sonucu

Aronya meyve ekstrelerinin uygulandığı kanser hücre hatları olan MCF-7 ve HeLa hücre hattı ile sağlıklı HUVEC hücre hattından gelen IC₅₀ değerlerinin birbirine orantılanması sonucu bitki ekstrelerinin en iyi hangi hücreler üzerinde etkili olduğuna dair karşılaştırma sonuçları elde edilmiştir (Tablo 4.14.). Seçicilik indeksi olarak tanımlanan bu karşılaştırma da aronya bitkisi etanol ekstresinin seçicilik indeksi olarak 3,69 değeri ile MCF-7 hücre hattında en iyi antikanserojen aktivite gösterdiği, yine aronya bitkisi metanol ekstresinin ise 4,62 seçicilik indeksi değeriyle HeLa hücre hattında en yüksek antikanserojen aktiviteyi gösterdiği görülmektedir. Yine bitki ekstrelerinin Seçicilik indeksi değerlerinin HeLa hücrelerinde daha yüksek olduğu da Tablo 4.14.' de görülmektedir.

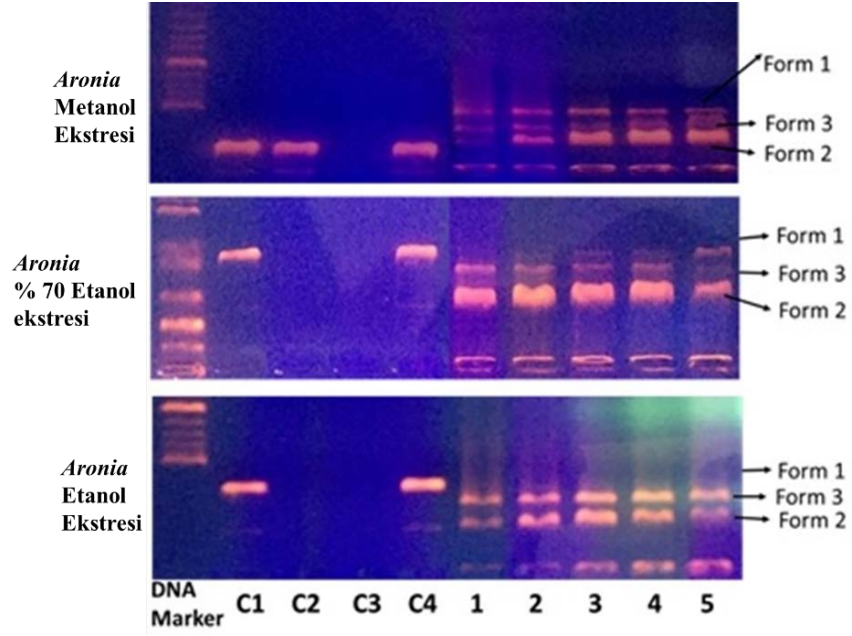
Tablo 4.14. *Aronia melanocarpa* meyve ekstralarının HUVEC, MCF-7 ve HeLa hücre hatlarındaki IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılmasından elde edilen Seçicilik İndeksi (Selectivity Index).

Seçicilik İndeksi		
Ekstre	IC ₅₀ (HUVEC/MCF-7)	IC ₅₀ (HUVEC/HeLa)
Metanol	1,75	4,62
%70 Etanol	1,84	4,42
Etanol	3,69	4,32
Etil asetat	2,19	1,78
Hekzan	0,69	2,80
Su	1,34	3,99

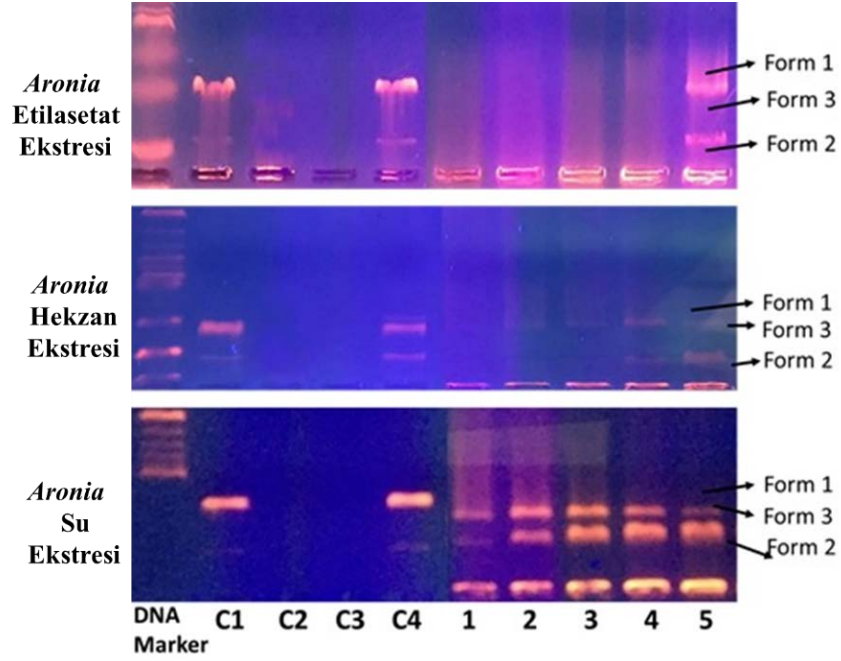
4.3.5. DNA hasarını önleyici aktivite sonuçları

Bu tez çalışmamızda; pBR322 plazmit DNA'sına 6 farklı aronya meyve ekstresi ile muamele edilmiş ve ekstraların kapalı dairesel pBR322 plazmit DNA'sının süper sarmalını modifiye etme yetenekleri araştırılmıştır. Bu yöntemle göre, bitki ekstralarının DNA hasarını önleme yeteneği, DNA'ya zarar veren faktörler olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve UV ışığı varlığında değerlendirilmiştir. DNA hasarına karşı bitki ekstralarının koruyucu etkisinin görüldüğü resimlerde, jel üzerinde plazmit DNA'sının 2 bandı arasında form I ve form II bantlarının yoğunluğunun azalmasıyla birlikte, form III bandının ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 3.5.).

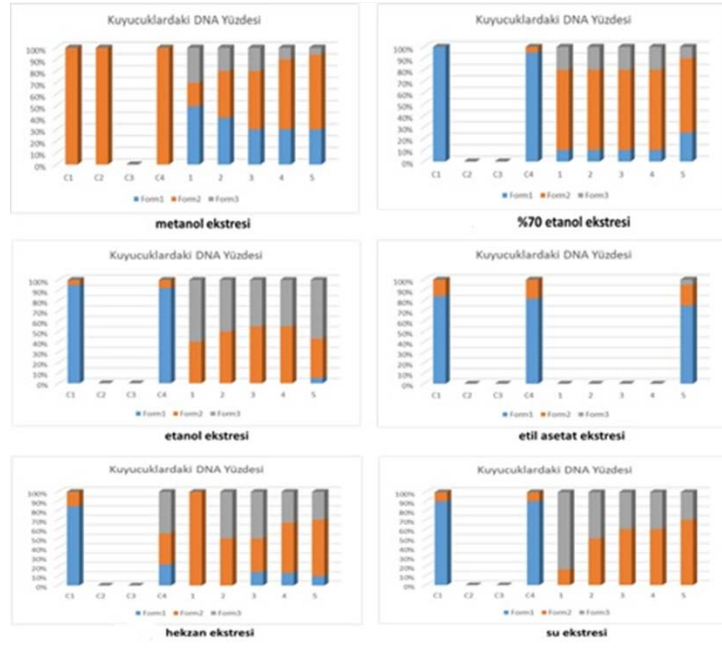
Aronya meyvesinin hekzan ve etil asetat ekstralarının plazmit DNA'sı üzerindeki koruyucu aktivitesinin düşük olduğu, diğer ekstraların ise plazmit DNA'sını yüksek dozlarda çok iyi bir şekilde hasardan korudukları ama düşük dozlarda biraz daha az aktivite gösterdikleri bulunmuştur (Görsel 4.6.; Görsel 4.7. ve Şekil 4.24.). Aronya bitkisinin metanol ve %70 lik etanol ekstralarının plazmit DNA'sının süper sarmal DNA yapısını koruyabildiği, jel üzerinde Form 1 bantlarının varlığı ile gösterilmiştir. Aronya bitkisinin su ekstralarının uygulandığı örneklerde ise Form 1 bantlarının olmamasına rağmen Form 2 ve Form 3 bantları jel üzerinde oldukça net olarak belirlenebilmiştir (Görsel 4.6.; Görsel 4.7. ve Şekil 4.24.).



Görsel 4.6. Aronia meyvesinin metanol, %70 etanol ve etanol ekstralarının DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi. (1.Sütun: DNA büyüklük belirteci, C1 Sütunu: Plazmit DNA + distile su, C2 Sütunu: Plazmit DNA + distile su+ UV, C3 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + UV+ Hidrojen peroksit, C4 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + Hidrojen peroksit, 1-5 numaralı sütunlar arasında: Plazmit DNA + Aronia meyve ekstresi (Sırasıyla en düşük derişimden en yüksek derişime kadar), 5 numaralı sütunlarda: Plazmit DNA + doğrudan stok derişimindeki Aronia meyve ekstresi kullanılmıştır.)



Görsel 4.7. Aronia meyvesinin etil asetat, hekzan ve su ekstralarının DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi. (1.Sütun: DNA büyüklük belirteci, C1 Sütunu: Plazmit DNA + distile su, C2 Sütunu: Plazmit DNA + distile su+ UV, C3 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + UV+ Hidrojen peroksit, C4 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + Hidrojen peroksit, 1-5 numaralı sütunlar arasında: Plazmit DNA + Aronia meyve ekstresi (Sırasıyla en düşük derişimden en yüksek derişime kadar), 5 numaralı sütunda: Plazmit DNA + doğrudan stok derişimindeki Aronia meyve ekstresi kullanılmıştır.)



Şekil 4.24. Aronia meyvesinin farklı ekstraktlarının plazmit DNA hasarı giderici etkisinin değerlendirilmesi

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmamızın konusunu oluşturan meyveler Rosaceae familyasına ait *Aronia melanocarpa* (Micxh.) Elliot bitkisinden elde edilmekte ve siyah aronya olarak bilinmektedir. Hemen her iklim şartına ve toprağa kolayca uyum sağlayan bir cins olan aronya, fenolik bileşiklerce zengin içeriği, yüksek antioksidan kapasitesine sahip olması, insan sağlığına ve beslenmesine faydaları sebebi ile ‘süper meyve’ ismi ile de anılmaktadır.

Uzun yıllar boyunca; meyveler öncelikle taze olarak tüketilmiş, daha sonra peksimet yapılarak değerlendirilmiş, gribal enfeksiyonlarda çay şeklinde demlenmiştir. Taze meyve olarak veya kurutulmuş halde, taze sıkılmış suyu, reçel, şerbet, sos, kek ve dondurmaların terkiibinde kullanılmakta, ayrıca gıda endüstrisinde besinlerin renklendirilmesinde doğal hammaddesi olarak değerlendirilmektedir.

Tedavide en sık kullanıldığı durumlar; soğuk algınlığı, sindirim sistemi hastalıkları, karaciğer, safra kesesi ve çeşitli kalp damar sistemi sorunları olduğu bilinmektedir. *Aronia melanocarpa* antioksidan etkinliği fazla olan, antosiyanin bakımından oldukça zengin bir üzünsü meyvedir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda; mide ülseri, kolon kanseri, diyabet gibi hastalıklar üzerine aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.

Jakobek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; siyah aronya (*Aronia melanocarpa*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), kırmızı ahududu (*Rubus idaeus*) ve çilek (*Fragaria ananassa*) meyvelerinin toplam polifenol, toplam antosiyanin miktarları ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş. Aronyanın incelenen meyveler arasında en yüksek miktarda polifenol ve antosiyanin madde içerdiği, aynı zamanda en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada aronyanın içeriğindeki flavonollerin (kersetin, kemferol, mirisetin,) ve antosiyaninlerin miktarı HPLC yöntemi kullanılarak detaylı olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak; en yüksek miktarda bulunan antosiyaninlerin siyanidin türevlerinden; siyanidin-3-galaktozit (%68,9) ve siyanidin-3-arabinosid olduğu; kersetin (%24,5) oranının ise toplam flavonol miktarının %93.07 sini oluşturduğu, kemferol seviyesinin düşük (%6,93), mirisetinin ise gözlenemediği tespit edilmiştir (Jakobek vd., 2007).

Üzünsü meyvelerdeki fenolik bileşiklerin biyoaktivitesi ve miktarını tartışmak için yapılan bir diğer çalışmada; yaban mersini, böğürtlen, siyah frenk üzümü, mavi yemiş, aronya, turna yemişi, ahududu ve çilek meyvelerinin 100 g taze ağırlıktaki

fenolik bileşik miktarları karşılaştırılmıştır. En yüksek fenolik içeriğin sırasıyla aronya, yaban mersini, siyah frenk üzümü ve çilekte olduğu tespit edilmiştir (Çağlar ve Demirci, 2017).

Deneva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 10 patojene karşı antimikrobiyal aktivite testine göre, siyah aronya proantosiyanidinleri meyvedeki en güçlü antimikrobiyal ajanlar olarak tespit edilmiştir (Deneva vd., 2019).

Yeni potansiyel doğal antioksidan kaynakları bulmak amacıyla yapılan bir çalışmada; ekim ayının ortasında Polonya'dan toplanan *Aronia melanocarpa* meyveleri, meyve suyu ve posa gibi ürünlerinin polifenolik içeriği araştırılmıştır. Sonuçlar; ağırlıklı olarak (-) epikateşinden oluşan polimerik proantosiyaninlerin, aronyadaki ana polifenolik bileşik sınıfı olduğunu ve meyve polifenollerinin %66'sını temsil ettiğini, antosiyaninlerin ise ikinci fenolik bileşik grubu oluşturduğunu ve toplam polifenollerin yaklaşık %25'ini temsil ettiğini göstermiştir. Meyvelerin kafeik asitler, (-) epikateşin, siyanidin ve kersetin türevleri gibi yüksek antioksidan aktiviteye sahip zengin miktarda polifenoller içerdiği; posalarının, meyve suyu ve meyvelere kıyasla çok daha yüksek bir fenolik içeriğine sahip olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (Oszmiański ve Wojdylo, 2005).

Letonya'da yapılan bir çalışmada *Aronia melanocarpa* ya ait taze, kurutulmuş ve dondurulmuş meyvelerden sulu ve etanolik ekstrakter hazırlanarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ekstrelerin *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ya karşı antibakteriyel aktivite sergilediği, ancak *Escherichia coli* üzerinde bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşmışlardır (Liepiņa vd., 2013).

Sharif ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; *Aronia melanocarpa* meyve suyunun fare embriyonal karsinom hücrelerindeki kök hücre dizisi P19 üzerine etkileri araştırılmış; deney sonucunda aronya meyve suyunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozun indüklenmesine neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sharif vd., 2013).

Aronia melanocarpa yaprak ekstrakterinin insan kolon adenokarsinoma hücre dizisi Caco-2 üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; ekstrakterin antiproliferatif aktivitesi, MTT testi kullanılarak ölçülmüş. Sonuç olarak; *A. melanocarpa* yaprak ekstresinin antikanser aktivite gösterebileceği düşünülmüştür (Efenberger-Szmechtyk vd., 2020).

İnsan embriyonal böbrek hücre hattı HEK293T'de sisplatin kaynaklı sitotoksosite modelinde *Aronia melanocarpa* meyve suyunun koruyucu potansiyelini araştırmayı

hedefleyen bir çalışmada; aronya meyve suyunun sisplatin ilacının *in vitro* sitotoksitesini konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli ölçüde iyileştirdiği kanıtlanmıştır. Bu çalışmada gözlemlenen *Aronia melanocarpa* meyve suyunun koruyucu etkisinin, büyük olasılıkla, oksidatif stresin sisplatinin toksik etkilerinde merkezi bir rol oynadığı ve aronya meyvelerinin de iyi bilinen kuvvetli antioksidan aktivitesinden dolayı gerçekleştiği düşünülmüştür (Valcheva-Kuzmanova vd., 2013).

Bu çalışmada; Kırklareli bölgesinde kültür olarak yetiştirilmekte olan *Aronia melanocarpa* meyveleri farmakognozik açıdan incelenmiştir. Çalışmada meyvelerin metanol, %70 etanol, etanol, etil asetat, hekzan ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Elde edilen ekstraktların verim hesapları yapılmış, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kimyasal içerikleri aydınlatılmış, toplam fenolik, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin madde miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Ekstraktların antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH•, ABTS•+, Metal şelatlama, CUPRAC ve Lipid peroksidasyon yöntemleri kullanılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal aktiviteleri için mikrodilüsyon yöntemi çalışılmış ve etkili oldukları bakteri ve maya mikroorganizmaları belirlenmiştir.

Antikanser aktivite tayini için meme kanseri (MCF-7) ve serviks kanseri (HeLa) hücre hatları üzerinde, sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki tayininde ise insan endotelial (HUVEC) ve fare fibroblast (L929) hücre hatları üzerinde MTT yöntemi kullanılmış ve ekstraktlar etkinlik açısından karşılaştırılmıştır.

Ekstraktların DNA hasarını önleyici etkileri jel elektroforez yöntemi kullanılarak pBR322 plazmit DNA'sı üzerinde incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında; bitkinin meyvelerinden farklı polariyete sahip çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının hesaplanan verimlerinin %1,25 g ve %68,6 g arasında olduğu görülmektedir. En yüksek olandan en düşük olana doğru sırasıyla ekstrakt verimlerinin; metanol> %70 etanol> su> etanol> etil asetat> hekzan olduğu belirlenmiştir.

Deneyler için hazırlanan 6 farklı ekstraktın HPLC analizi sonuçlarına göre; metanol, %70 etanol, etanol ve etil asetat ekstraktlarında referans olarak analiz edilen standart fenolik bileşiklerden tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerce en zengin ekstraktın etil asetat ekstresi olduğu; kersetin-3-galaktozit, kafeik asit, p-kumarik asit ve kersetin bileşiklerini içerdiği ortaya konulmuş ve Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.

Deneyler için hazırlanan 6 farklı ekstrenin HPLC analizi sonuçlarına göre; yalnızca metanol ekstresinde referans olarak analiz edilen standart antosiyanin bileşiklerinden; malvin ve malvidin-3-o-glukozit tespit edilmiştir. Eldeki sonuçlara göre %70 etanol, etanol ve su ekstralarının de farklı antosiyanin bileşikleri içerdiği görülmüş ancak karşılaştırma yapabilmek için laboratuvar şartlarımızda standart madde olmaması sebebi ile hangi antosiyanin bileşiği olduğu tespit edilememiştir.

Aronya meyve ekstralarının toplam fenolik madde miktar tayinleri Folin-Ciocalteu's metodu ile belirlenmiş ve sırasıyla etil asetat> metanol> etanol> %70 etanol> su> hekzan şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek fenolik madde içeren ekstrenin etil asetat ile hazırlanan ekstre olduğu ve $48,28 \pm 15,51$ mg GAE/g ekstre fenolik madde içerdiği, en düşük fenolik madde içeren ekstrenin ise hekzan ile hazırlanan ekstre olduğu ve $24,36 \pm 11,99$ mg GAE/g ekstre fenolik madde içerdiği saptanmıştır.

Aronya meyve ekstralarının toplam flavonoit madde miktarı Alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik metodunun modifiye edilmesiyle tayin edilmiş ve sırasıyla etil asetat> etanol> %70 etanol> metanol> su> hekzan şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek flavonoit madde içeren ekstrenin etil asetat ile hazırlanan ekstre olduğu ve $15,935 \pm 0,158$ mg QE/g ekstre flavonoit madde içerdiği, en düşük flavonoit madde içeren ekstrenin ise hekzan ile hazırlanan ekstre olduğu ve $9,832 \pm 0,111$ mg QE/g ekstre flavonoit madde içerdiği saptanmıştır.

Aronya meyve ekstralarının toplam antosiyanin madde miktar tayinleri pH diferansiyel metodu ile belirlenmiş ve sırasıyla metanol> etanol> %70 etanol> su şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Veriler incelendiğinde; en yüksek antosiyanin madde içeren ekstrenin metanol ile hazırlanan ekstre olduğu ve $8,649 \pm 0,192$ mg Cyn-3-glu/g ekstre antosiyanin madde içerdiği, en düşük antosiyanin madde içeren ekstrenin ise su ile hazırlanan ekstre olduğu ve $6,221 \pm 0,158$ mg Cyn-3-glu/g ekstre antosiyanin madde içerdiği saptanmıştır. Etil asetat ve hekzan ekstralarına ait absorbans değerleri belirlenememiştir.

Hazırlanan ekstraların antioksidan kapasitesi aşağıdaki 5 ayrı yöntem ile belirlenmiştir;

DPPH• yöntemine göre; serbest radikalleri inhibe etme özelliğinin en yüksek olduğu ekstre metanol, en düşük olduğu ekstrenin ise hekzan ekstresi olduğu tespit edilmiştir.

ABTS^{•+} yöntemine göre; troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi hesaplanmış ve radikal süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu ekstre etanol, en düşük olduğu ekstrenin ise etil asetat ekstresi olduğu tespit edilmiştir.

Metal şelatlama yöntemine göre; denediğimiz tüm bitki ekstraları içerisinde sonuçları birbirine çok yakın olmakla beraber, etanol ekstresinin metal şelatlama aktivitesinin diğerlerine göre en yüksek olduğu, hekzan ekstresinin ise metal şelatlama aktivitesinin diğerlerine göre en düşük olduğu tespit edilmiştir.

CUPRAC yöntemine göre; antioksidan aktivitenin en yüksek olduğu ekstre etanol, en düşük olduğu ekstrenin hekzan ekstresi olduğu tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyon yöntemine göre; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm ekstraların benzer değerlere sahip olduğu belirlenmiş, anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Aronia melanocarpa meyvelerinin 6 farklı çözücü ile hazırlanmış ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi MİK yöntemine göre belirlenmiştir. Mevcut bulgular neticesinde; aronya meyve ekstralarının genel olarak bazı mikroorganizmalar üzerinde orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve etanolik ekstralarının diğer ekstralara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma sonucunda aronya meyve ekstralarının *B. cereus* mikroorganizması üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

In vitro antikanser aktivite tayini için meme kanseri (MCF-7) ve serviks kanseri (HeLa) hücre hatlarında uygulama yapılmış, sitotoksik aktiviteleri MTT testi kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak; aronya meyvelerinin tüm ekstralarının MCF-7 ve HeLa hücre hatları üzerinde orta düzeyde sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu, tüm ekstraların HeLa hücre hattında daha etkili olduğu, etanol ve metanol ekstralarının ise diğerlerine göre bu hücreler üzerinde daha fazla hücre canlılığını azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir.

In vitro sitotoksik aktivite tayini için insan endotelial (HUVEC) ve fare fibroblast (L929) hücre hatlarında uygulama yapılmış, sitotoksik aktiviteleri MTT testi kullanılarak incelenmiş ve ekstralar etkinlik açısından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; aronya meyvelerinin tüm ekstralarının sağlıklı hücre hatları HUVEC ve L929 üzerinde sitotoksik etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir. Doğal herhangi bir maddenin veya bitkilerden elde edilmiş ekstrenin veya tek bir etken maddenin sağlam hücrelere zarar vermezken, kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkili olması, onun geleceğe yönelik

olarak ilaç maddelerinin geliştirilmesinde potansiyel taşıyabileceğini düşündürmektedir. Bu kapsamda, aronya bitkisi meyve ekstralarının denenene HUVEC ve L929 sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin olmayışı ümit vericidir.

DNA hasarı önleyici aktivitesi incelendiğinde; hekzan ve etil asetat ekstralarının plazmit DNA'sı üzerindeki koruyucu aktivitesinin düşük olduğu, diğer ekstraların ise plazmit DNA'sını yüksek dozlarda çok iyi bir şekilde hasardan korudukları ama düşük dozlarda biraz daha az aktivite gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır.

Genel olarak bitki ekstralarının içerisinde yüzlerce bileşiğe sahip oldukları bilinmektedir ve bu bileşenlerden hangisinin gerçek terapötik nitelikte biyolojik aktivitelere sebep olduğunun anlaşılabilmesi farmakognozik çalışmalar için çok önemlidir. Ancak tüm bitkilerin ayırt edilmeksizin, ön çalışmalar yapılmaksızın ileri farmakognozik deney süreçlerine başlatılması ekonomik ve zaman yönetimi açısından mümkün değildir. Bu çalışma ile birlikte araştırılan aronya bitkisi ekstralarının da gerek içerik ve gerekse de taşıdıkları aktivite değerleriyle ayrıntılı çalışmalara yol gösterebilecek nitelikte olduğu söylenebilir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler neticesinde; *Aronia melanocarpa* türüne ait meyvelerin yüksek antioksidan, antikanser, DNA hasarını önleyici aktiviteleri ve düşük sitotoksiteleri sayesinde kanser tedavisinde yeni doğal kaynakların, yeni ilaçların ve tedavi ajanlarının geliştirilmesinde literatüre katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, *in vivo* deneyler de dahil olmak üzere daha gelişmiş ve geniş kapsamlı tekniklerin uygulanmasıyla, bu ekstraların antikanser aktivite mekanizmaları hakkında daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Afshar, F.H., Delazar, A., Janneh, O., Nazemiyeh, H., and Pasdaran, A. (2011). Evaluation of antimalarial, free-radical-scavenging and insecticidal activities of *artemisia scoparia* and *A. spicigera*, Asteraceae. *Bras Farmacogn*, 21: 986-990.
- Ağaoğlu, Y.S. (2003). Türkiye’de üzüksü meyvelerin dünü bugünü ve yarını, *Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Ordu, 23-25 Ekim, S: 1-14.
- Akalın, G. ve Selamoğlu, Z. (2019). Nutrition and foods for skin health. *J Pharm Care*, 7 (1-2): 31-33.
- Al-Qubaisi, M., Rozita, R., Yeap, S.K., Omar, A.R., and Ali, A.M. (2011). Selective cytotoxicity of goniotalamin against hepatoblastoma hepg2 cells. *Molecules*, 16 (4): 2944-2959.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E.A. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin c and e using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
- Ardağ, A. (2008). *Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması*, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Arıkan, H. (2019). *Inula graveolens* (L.) desf. bitkisi üzerinde farmakognozik çalışmalar. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., and Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49 (6):462-468.
- Atlı Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2009). Oksidatif mitokondrial hasar ve yaşlanmadaki önemi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2): 69-74
- Awouafack, M.D., McGaw, L.J., Gottfried, S., Mbouangouere, R., Tane, P., Spiteller, M., and Eloff, J.N. (2013). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 289.
- Aydın, G. (2021). *Lupinus angustifolius* L. subsp. angustifolius (Fabaceae) Taksonunun Antioksidan, Anti-Tüberküloz ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O.I. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1(2).
- Banjari, I., Misir, A., Šavikin, K., Jokić, S., Molnar, M., De Zoysa, H.K.S., and Waisundara, V.Y. (2017). Antidiabetic effects of *Aronia melanocarpa* and its other therapeutic properties. *Frontiers in Nutrition*, 4 (November), 1–6.
- Barut Uyar, B., Gezmen Karadağ, M., Sanlier, N., and Günyel, S. (2013). Toplumumuzda sıklıkla kullanılan bazı bitkilerin toplam fenolik madde miktarlarının saptanması. *Gıda*, 38 (1):23-29.

- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., and Bertelli, D. (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and radical scavenging activity of Rubus, Ribes and Aronia. *J Food Sci.* 69:164–169.
- Berk, Ş. (2012). *Myrtus communis*, *Pistacia vera*, *Arum maculatum*, *Ceterach officinarum*, *Inula oculus-christi* türlerinin antioksidan, anti-mikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerinin araştırılması. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, p: 93.
- Berlin, B. and Zuzek, K. (2017). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). <http://www.extension.umn.edu/garden/yard-garden/trees-shrubs/black-chokeberry/>- (Erişim tarihi: 12.01.2022).
- Bermúdez-Soto, M.J., Larrosa, M., Garcíacantalejo, J., Espin, J., Tomás-Barberán, F.A., and García-Conesa, M.T. (2007b). Up-Regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *J Nutr Biochem*, Apr;18 (4):259–71.
- Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T. (2007a). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102 (3): 865-874.
- Boğatarkan, Ç., Utku, and S., Acik, L. (2015). Synthesis, characterization and pbr322 plasmid dna interaction of platinum (II) complexes with imidazole and 2-phenylimidazole as carrier ligands, *rev. Roum. Chim.*, 60 (1), 59-64.
- Brand, M. (2010). Aronia: native shrubs with untapped potential. *Arnoldia*, 67 (3): 14-25.
- Burçak, G. ve Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.*, 35: 159-169.
- Celep, E., Aydın, A., Yeşilada, E. (2012). A comparative study on the *in vitro* antioxidant potentials of three edible fruits: cornelian cherry, japanese persimmon and cherry laurel. *Food Chem Toxicol*, 50 (9), 3329-3335.
- Cemeroğlu, B. (2007). Gıda analizleri, birinci baskı, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, Ankara.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 10, 178-182.
- Chopra, S. and Wallace, H.M. (1998). Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*, Apr 1;55 (7):1119-23.
- Chrubasik, C., Li, G., and Chrubasik, S. (2010). The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytotherapy Research*, 24 (8), 1107–1114.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., and Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38 (6), 421-464.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564–582.

- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., and Dyatmik, W. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 1144- 1152.
- Çağlar, M.Y. ve Demirci, M. (2017). Üzümsü meyvelerde bulunan fenolik bileşikler ve beslenmedeki önemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7 (11), 18-26.
- Daştan, S.D., Daştan, T., Çetinkaya, S., Ateşşahin, D., and Karan, T. (2016). Evaluation of *in vitro* anticancer effect of *Plantago major* L. and *Plantago lanceolata* L. leaf extracts from Sivas. *Cumhuriyet Üniv. Sağ. Bil. Enst. Derg.*, 1(1): 07-14.
- Daştan, S.D., Daştan, T., Gülhan, M.F., Kırkbeş, A., and Talas, Z.S. (2014). Biochemical changes in muscle and gill tissues of rainbow trout reared with various concentrations of pollen extract. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*, 4 (10): 540-544.
- Daştan, T. (2017). Bazı bis (a-aminoalkil-fosfinik asit) türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması, Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Decker, E.A. and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677.
- Demir, N., Yıldız, O., Alpaslan, M., and Hayaloğlu, A.A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey. *Food Science and Technology*, 57:126-133.
- Deneva, P., Číž, M., Kratchanovaa, M., and Blazhevad, D. (2019). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chemistry*, 284:108–117.
- Dinçer, Y. ve Akçay, T. (2000). DNA hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(2): 73-79.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.C., and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315: 161-169.
- Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Res.*, 75: 331-342.
- Dündar, E., Çiftçi, G.A., and Altıntaş, A. (2017). Anticancer activity of *Centaurea babylonica* L., presented at the 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy. Kayseri, Turkey, 8–11 November.
- Dündar, E. (2017). *Centaurea babylonica* L. bitkisi üzerinde farmakognozik araştırmalar. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., and Agnieszka Nowak, A. (2020). Cytotoxic and dna-damaging effects of *Aronia melanocarpa*, cornus mas, and chaenomeles superba leaf extracts on the human colon adenocarcinoma cell line caco-2. *Antioxidants*, 9 (11), 1030.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64:711-713

- Engels, G. and Brinkman, J. (2014). Black chokeberry *Aronia melanocarpa*. American Botanical Council. *Herbal Gram*, (101): 1-5.
- Eren, E. (2011). Bazı soğansız bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymology*, 186: 407-421.
- Farina, A., Doldo, A., Cotichini, V., Rajevic, M., Quaglia, M.G., Mulinacci, N., and Vincieri, F.F. (1995). HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva silvestris* L.: A comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (1-2), 203-211.
- Fersahoğlu, H. (2016). Farklı renklerdeki gülhatmi çiçeklerinin biyoaktif özellikleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Fidancı, A. (2015). Türkiye için yeni bir minör meyve: aronya bitkisi ve yetiştirme teknikleri. VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, *Bahçe (Özel Sayı)*, Cilt I: Meyvecilik, s: 1177-1180.
- Frankel, E.N. and Meyer, A.S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80:1925-1941.
- Gajula, D., Verghese, M., Boateng, J., Walker, L.T., Shackelford, L., Mentreddt, S.R., and Cedric, S. (2009). Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemopreventive potential of basil. *Int. J. Cancer Res.*, 5, 130–143.
- Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, L.A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., and Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 1445-1447.
- Gazor, R., Asgari, M., Pasdaran, A., Mohammadghasemi, F., and Nasiri, E. (2017). Evaluation of hepatoprotective effect of *Acantholimon gilliati* aerial part methanolic extract. *Iran J Pharm Res*, 16: 135-141.
- Gel Doc EZ, Bio-Rad. Gel Doc EZ Gel Documentation System. <https://www.bio-rad.com/en-tr/product/geldoc-Ez-gel-documentation-system?ID=O4950KKG4>, (Erişim tarihi Mayıs 15, 2021)
- Gliszczyńska-Świgło, A., Ciska, E., and Pawlak-Lemańska, K. (2006). Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Additives and Contaminants*, 23 (11): 1088-1098.
- Goyal A. and Tailor C. S. (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum onyzoides* Linn. leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4), 244-249.
- Gökgöz, Y. (2015). Burdur ili pazarlarında satılan bazı meyvelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

- Gönenç, T.M., Kayalar, H., Erdoğan, T., and Kıvçak, B. (2014). A comparative assessment of α -tocopherol content and antioxidant activity of some fresh and commercial fruit juices. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (2); 215–220.
- Graves, S. (2013). Excretion of phenolic compounds after consumption of fresh versus aged chokeberry juice in rats (Msci thesis). University of Arkansas. *Bachelor of Science in Food Science*, 40p.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S.E., and Apak, R. (2006). Antioxidant capacity of fresh, sun and sulphited-dried malatyaapricot (*Prunus armeniaca*) assayed by cuprac, abts/teac and folin methods. *International Journal of Food Science And Technology*, 41(Supplement 1), 76–85.
- Gültekin, M. ve Öztürk, Ş. (2020). Adıyaman akdağ (tut-erkenek) bölgesinden toplanan *Achillea clusiana* ve *Centranthus longiflorus* türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9 (2) 125-134.
- Güzel, N. (2021). Alıç: biyoaktif bileşenlerin termosonikasyon ile ekstraksiyonu ve fiziko-kimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi. *Gıda The Journal of Food*, 46 (4) 939-948.
- Hakkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Ruuskanen, J., and Torronen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res Int.*, 32: 345–353.
- Hannan, J.M. (2013). Aronia berries profile, Iowa State University extension and outreach. *Commercial Horticulture Field Specialist*, October, USA.
- Hao, M.L., Pan, N., Zhang, Q.H., and Wang, X.H. (2015). Therapeutic efficacy of chlorogenic acid on cadmium-induced oxidative neuropathy in a murine model. *Exp. Ther. Med.*, 9:1887-94.
- Horgan, G.W. ve Glasbey, C.A. (1995). Uses of Digital Image Analysis in Electrophoresis. *Electrophoresis*, 16 (1), 298–305.
- Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K. K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chem.*, 115, 441-448.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Ijaz, F., Iqbal, Z., Rahman, I.U., Ali, N., and Qadir, G. (2017). The role of plants in human welfare. *J Tradit Med Clin Natur.*, 6: 214.
- İçli, N. (2017). Determination of total phenolic compounds, total antioxidant capacity and total flavonoid compounds in apple sour. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 2 (2): 89-99.
- İşbilir, Ş. S. (2008). Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- İşcan, G. (2017). Antibacterial and anticandidal activities of common essential oil constituents. *Records of Natural Products*, 11 (4):374-388.

- İzol, S.N. (2021). Farklı zamanlarda hasat edilen *Salvia sclarea* L. bitkisinin biyolojik aktivite çalışmaları. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., Novak, I., and Strossmayer, J.J. (2007). Antioxidant activity and polyphenols of aronia in comparison to other berry species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72 (4), 301–306.
- Jeppsson N. (2000). The effect of cultivar and cracking on fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and hybrids between chokeberry and rowan. *Gartenbauwissenschaft*, 65: 93–8.
- Jurikova, T., Mlcek, J., Skrovankova, S., Sumczynski, D., Sochor, J., and Hlavacova, I. (2017). Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*, 7;22 (6):944.
- Kandepu, N.M. (1999). Mannich bases of chalcones and cyclohexanones as candidate cytotoxic agents. Ottawa: University of Saskatchewan.
- Karadağ, A.E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M.E., Orak, D., and Başer, K.H.C. (2019). *In vitro* antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. *South African Journal of Botany*, 125, 214-220.
- Kedzierska, M., Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W., Jeziorski, A., and Piekarski, J. (2010). The nitrative and oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients: the protectory action of *Aronia melanocarpa* extract. *Platelets*, 21 (7): 541-548.
- Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., and Lim, S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61 (1), 1361779.
- Kırca, A. (2004). Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Knudson, M. (2009). Plant guide for black chokeberry (*Photinia melanocarpa* (michx.), *usda-natural resources conservation service*. <http://plant-materials.nrcs.usda.gov> (Erişim tarihi, 14.01.2022).
- Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., and Luczkiewicz, M. (2010). Aronia plants: a review of traditional use biological activities and perspectives for modern medicine. *Journal of Medicinal Food*, 13 (2), 255–269.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923–933.
- Köse, Y.B., Işcan, G., and Demirci, B. (2016). Antimicrobial activity of the essential oils obtained from flowering aerial parts of *Centaurea lycopifolia* Boiss. et Kotschy and *Centaurea cheirollopha* (Fenzl) Wagenitz from Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19:3, 762-768.
- Kuete, V. (2010). Potential of cameroonian plants and derived products against microbial infections. *Planta Medica*, 76:1479-1491.

- Kulling, S.E. and Rawel, H.M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74: 1625–1634.
- Kumar, S. (2011). Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Pelagia Research Library*, 2(1), 129-135.
- Lazar, I. (2021). Gel analyzer 19.1. [Http://www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com), (Erişim tarihi Mayıs 15, 2021)
- Lee, L, Rodriguez, J., and Tsukiyama, T. (2015). Chromatin remodeling factors Isw2 and Ino80 regulate checkpoint activity and chromatin structure in s phase. *Genetics*, 199 (4):1077-91.
- Liepiņa, I., Nikolajeva, V., and Jākobsone, I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environmental and Experimental Biology*, 11: 195–199
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F., and Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: a review. *In Frontiers in Chemistry*, Vol. 6, p. 52.
- Miller, M., Rao, J.K., Wlodawer, A., and Gribskov, M.R. (1993). A left-handed crossover involved in amidohydrolase catalysis, crystal structure of *Erwinia chrysanthemi* l-asparaginase with bound l-aspartate. *FEBS Lett*, 328 (3):275-9
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Oszmiański, J. and Lachowicz, S. (2016). Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, 21, 1098.
- Oszmiański, J. and Wojdyło, A. (2005). *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221 (6), 809–813.
- Özdemir, K. ve Eroğlu Özkan, E. (2020). *Aronia* sp. meyvelerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. *Ankara Ecz. Fak. Dergisi*, 44 (3): 557-570.
- Özgen, S., Kılınç, O.K, and Selamoğlu, Z. (2016). Antioxidant activity of quercetin: a mechanistic review. *TURJAF*, 4: 1134-1138.
- Özkara, K. (2019). Elektroforez Görüntü İşleme Arayüzü ve Yazılımı Geliştirme, Karabük Üniversitesi, Lisansüstü Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Papandreou, M.A, Kanakis, C.D., Polissiou, M.G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Margarity, M., and Lamari, F.N. (2006). Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (23): 8762-8768.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., and Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging and promoting quality life – a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 299–308.
- Parlak, A.E. and Koparır P. (2018). *In vitro* antioxidant properties of novel compound (1R, 2R) -1,2-bis- (5- (4- Hydroxynaphthalen-1-ylazo) - [1,3,4] Thiadiazol-2-YL) -Ethane- 1,2-Diole. *Cumhuriyet Sci. J.*, 39(3): 658-667.

- Parlak, A.E. ve Çelik, S. (2015). Bis-1,2,4-triazol içeren bazı mannich bazlarının biyolojik etkilerinin araştırılması. Uşak Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-92.
- Pavel, A.B. and Vasile, C.I. (2012). PyElph - A software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13 (1)
- Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., and Horoszkiewicz-Hassan, M. (2005). The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *J Sport Nutr Exercise Metabol*, 15 (1):48–58.
- Poyraz Engin S. (2020). ‘Nero’ ve ‘Viking’ aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot) çeşitlerinin agromorfolojik özellikleri ve farklı olgunluk seviyelerindeki meyve kalite parametrelerinin belirlenmesi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Poyraz Engin, S. ve Boz, Y. (2019). Türkiye ve Dünyada aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot) yetiştiriciliği. *Bahçe*, 48 (Özel Sayı 1): 247–252.
- Poyraz Engin, S., Boz, Y., Mert, C., Fidancı, A., and İkinci, A. (2018). Growing aronia berry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot). 1. International Gap Agriculture & Livestock Congress, 25-27 April, Şanlıurfa/Turkey, 664-667.
- Poyraz Engin, S., Mert, C., Fidancı, A., and Boz, Y. (2016). Aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) meyve türünde morfolojik incelemeler. *Bahçe*, 45 (Özel Sayı 2): 71-78.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 26:1231–1237.
- Rice-Evans, C.A. and Miller, N.J. (1984). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, 234: 279-293.
- Riss, T.L. and Moravec, R.A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn.*, 2 (1) 51- 62.
- Rugină, D., Sconța, Z., Leopold, L., Pintea, A., Bunea, A., and Socaciu, C. (2012). Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on hela human cervical tumor cells. *J. Med. Food*, (15) 700–706.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., and Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and dna cleavage protectors. *Cell biology and toxicology*, 16 (2): 91–98.
- Saraç, H., Daştan, T., Durukan, H., Durna Daştan, S., Demirbaş, A., Karaköy, T. (2018). Kırmızı gelincik (Fam: Papaveraceae, *Glaucium grandiflorum* Boiss.&Huet var. *grandiflorum*) bitkisinin farklı özütlerinin besin elementi içeriğinin ve *in vitro* antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi Özel Sayısı*, 417-428.

- Saraç, H., Daştan, T., Demirbaş, A., Durna Daştan, S., Karaköy, T., Durukan, H. (2018). Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) bitki özütlerinin besin elementleri ve *in vitro* antikanserojen aktiviteleri yönünden değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi Özel Sayısı*, 340-347.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future microbiol*, 7: 979–990.
- Selamoğlu, Z., Üstüntaş, H.E., and Özgen, S. (2016) Traditional and complementary alternative medicine practices of some aromatic plants in the human health. *Res J Biol.*, 4: 52-54.
- Selamoğlu, Z. (2017). Polyphenolic compounds in human health with pharmacological properties. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*, 6:4
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *J Funct Foods*, 18: 820-897.
- Sharif, T., Stambouli, M., Burrus, B., Emhemmed, F., Dandache, I., Auger, C., Etienne-Selloum, N., Schini-Kerth, V.B., and Fuhrmann, G., (2013). The polyphenolic-rich *Aronia melanocarpa* juice kills teratocarcinoma cancer stem-like cells, but not their differentiated counterparts. *Journal of Functional Foods*, 5 (3): 1244-1252.
- Shawmi, A.S. and Parhangi, C. (1980). *J.Heterocyclic chem.*, 17833
- Sidor, A. and Gramza-Michalowska, A. (2019). Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L.- A qualitative composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules*, 24 (20), 3710.
- Slimestad, R., Torskangerpoll, K., Nateland, H.S., Johannessen, T., and Giske, N.H. (2005). Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Comp. Anal.*, 18, 61–68.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., and Trombetta, D. (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytother. Res.* 30, 1265–1286.
- Šnebergrová, J., Čížková, H., Neradová, E., Kapci, B., Rajchl, A., and Voldřich, M. (2014). Variability of characteristic components of *Aronia*. *Czech J. Food Sci*, 32: 25–30.
- Takım, K. (2010). Kiraz yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin ve oksidatif DNA hasarı üzerine etkisinin belirlenmesi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Thani, N.A.A., Keshavarz, S., Lwaleed, B.A., Cooper, A.J., and Rooprai, H.K., (2014). Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line asp-1. *Journal of Clinical Pathology*, 67 (11): 949-954.
- Tokur, O. and Aksoy, A. (2017). *In vitro* sitotoksikite testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, 6 (1): 112-118.

- Tolic, M.T., Jurcevic, I.L., Krbavcic, I.P., Markovic, K., and Vahcic, N. (2015). Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technology and Biotechnology*, 53 (2): 171–179.
- Valcheva-Kuzmanova, S.V. and Belcheva, A. (2006). Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Medica*, 48 (2): 11.
- Valcheva-Kuzmanova, S.V., Beronova, A.B., and Momekov, G.T. (2013). Protective effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in a model of cisplatin-induced cytotoxicity *in vitro*. *Folia Med.*, 55 (3-4):76-9.
- Valcheva-Kuzmanova, S.V., Kuzmanov, K., Tancheva, S., and Belcheva, A. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 29 (2), 101–105.
- Walther, E. and Müller, S. (2012). Aronia, apfelbeere (*Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliott). handbuch des arznei- und gewürzpflanzenbaus, Ed.: Hoppe B., Band 4. Bernberg, Germany: Verein für Arznei- und Gewürzpflanzen Salupalnta, Bernberg, pp: 95-110.
- Wang, D. And Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (4):307-320.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R.L. and McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia* and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26): 7846-7856.
- Yıldız, İ. (2019). Türkiye’de yetişen bazı bitki türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yılmaz, A., Güler, E., Soydemir, H.E., Demirel, S., Mollahaliloğlu, S., Karadeniz, T., and Çiftçi, V. (2021). Mucize bitki: aronya (*Aronia melanocarpa*). *Mas Journal of Applied Sciences*, 6 (1): 83–94.
- Yılmaz, İ. (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17 (2) 143-153.
- <https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/TARYAT/Belgeler/Projeler/Aronya+Fizibilite+Raporu+ve+Yatirimci+Rehberi.pdf> (Erişim tarihi: 16.02.2022)