



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ETİL ALKOL İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ÇINAR (*Platanus orientalis* L.) YAPRAK İNFÜZYONUNUN DOKU
KORUYUCU ROLÜ VE FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özgür Ozan ANUK
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOĞAN

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL ALKOL İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ÇINAR (*Platanus orientalis* L.) YAPRAK İNFÜZYONUNUN DOKU
KORUYUCU ROLÜ VE FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özgür Ozan ANUK
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOĞAN

VAN-2018

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2018-TYL-6774 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalında Özgür Ozan ANUK tarafından hazırlanan “**Etil Alkol ile Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Çınar (*Platanus orientalis* L.) Yaprak İnfüzyonunun Doku Koruyucu Rolü ve Fitokimyasal İçeriğinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

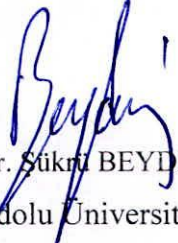
Tez Savunma Tarihi:19/10/2018



Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOĞAN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Anadolu Üniversitesi

Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Etil Alkol ile Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Çınar (*Platanus orientalis* L.) Yaprak İnfüzyonunun Doku Koruyucu Rolü ve Fitokimyasal İçeriğinin Araştırılması**” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özgür Ozan ANUK

Tarih: 19.10.2018

İmza: 

TEŞEKKÜR

Araştırma konusunu yüksek lisans tezi olarak ele almamı sağlayan, çalışmalarım sırasında zaman ve emeğini benimle paylaşan ve çalışmalarımı yönlendiren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOğAN'a teőekkürü bir borç bilirim. Çalışmada fitokimyasal içeriğinin elde edilmesinde katkısı olan Dr. Öğr. Üyesi Abdullah DALAR'a ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde başta Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL olmak üzere tüm akademik ve idari personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsü alışanlarına, Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurulu alışanlarına, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına ve çalışmamda her türlü desteği veren yüksek lisans çalışma arkadaşlarım Hanife Ceren HANALP, Ayşegül EROğLU, Ali Kemal ZİREK ve Fatih DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

ÖZET

Anuk, ÖO. Etil Alkol ile Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Çınar (*Platanus orientalis* L.) Yaprak İnfüzyonunun Doku Koruyucu Rolü ve Fitokimyasal İçeriğinin Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018. Çınar (*Platanus orientalis* L.) bitkisi kaempferol glikozit türevleri bakımından zengin olup, yılan ve akrep zehirlenmelerine, ses kısıklığı, diş ve diz ağrıları, yaralar, inflamasyon ve mide rahatsızlıklarına karşı halk hekimliğinde kullanılmasına rağmen karaciğer ve böbrek gibi organlar üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Çınar yapraklarından elde edilen infüzyonun doku koruyucu rolü ve fitokimyasal içeriği araştırıldı. Toksikite testinden sonra, etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda biyokimyasal değişiklikleri, lipid peroksidasyonunu ve antioksidan enzim seviyelerini test etmek için 20 mg/mL ve 60 mg/mL dozunda *Platanus orientalis* (PO) infüzyonu verildi. Ayrıca, karaciğer koruyucu özelliği bilinen silymarin pozitif kontrol olarak kullanıldı. Otuz adet Wistar cinsi erkek sıçan; Normal, %20 Etil alkol, %20 Etil alkol+Silymarin (10 mg/kg), %20 Etil alkol+PO-20 mg/mL infüzyon ve %20 Etil alkol+ PO-60 mg/mL infüzyon olmak üzere beş gruba ayrıldı. Elde edilen *in vitro* sonuçlarına göre GC-MS analizinde ekstrede benzaldehit, palmitik asit, 2,4-Ditert-butylphenol, stearik asit, oktadekanoik asit, linoleik asit ve linolenik asitler belirlenirken; HPLC profilinde ise baskın bileşiğin kaempferol ve kaempferol türevleri oldukları belirlenmiştir. Etil alkol grubunda serum AST, ALT, LDH, GGT, ürik asit ve üre; karaciğer ve eritrosit dokularında ise GST ve MDA düzeyleri Kontrol grubuna göre önemli artış gözlenmiştir. Etil alkol+PO-60 mg/mL grubunda serum AST, LDH, GGT, ürik asit, LDL_C ve MDA (tüm dokularda) değerlerinde ise Etil alkol grubuna göre önemli düşüş belirlenmiştir. Ayrıca, Etil alkol grubu böbrek dokusunda SOD, GPx ve CAT aktiviteleri Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterirken tüm tedavi gruplarındaki GPx aktivitesi ise Etil alkol grubuna göre önemli artış gösterdi. Bulgular, Çınar yapraklarının belirlenen infüzyon dozlarının tüketimi etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çınar (*Platanus orientalis* L.), Silymarin, Antioksidan Enzimler ve Oksidatif Stres, Biyoaktif Bileşikler, Rat.

ABSTRACT

Anuk ÖO, Investigation of Tissue Protective Role and Phytochemical Composition of Chinar (*Platanus orientalis* L.) Leaf Infusion Against Ethanol-Induced Oxidative Stress In Rats, University of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy, Departments of Basic Pharmaceutical Sciences, Biochemistry Science, Master Thesis, Van, 2018. Chinar (*Platanus orientalis* L.) plant is rich in kaempferol glycoside derivatives and is used in folk medicine against snake and scorpion poisoning, hoarseness, tooth and knee pain, wounds, inflammation and stomach discomfort however the effects of chinar leaves on liver and kidney organs are unknown. The aim of this study was to investigate the tissue protective role and phytochemical content of infusion obtained from dried chinar leaves against ethanol-induced oxidative stress in rats. After toxicity test, the infusion of *Platanus orientalis* (PO) were given at a dose of 20 mg/mL and 60 mg/mL for testing the biochemical changes, lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels by ethanol induced oxidative stress in rats. In addition, silymarin known as liver-protective was used as positive control. Thirty male Wistar rats were divided into five groups which consist of Normal, Ethanol 20%, Ethanol 20%+Silymarin (10 mg/kg), Ethanol 20%+ PO-20 mg/mL infusion and Ethanol 20%+ PO-60 mg/mL infusion. According to the obtained *in vitro* results, benzaldehyde, palmitic acid, 2,4-Ditert-butylphenol, stearic acid, octadecanoic acid, linoleic acid and linolenic acid were determined in the GC-MS analysis in the extract. Additionally, the kaempferol and kaempferol derivatives were determined as dominant compound in the HPLC profile. In the Ethanol group, AST, ALT, LDH, GGT, uric acid and urea in serum and GST and MDA in liver and erythrocyte tissues showed a significant increase in levels compared to the Control group. AST, LDH, GGT, uric acid and LDL_C levels in serum and MDA (all tissues) significantly decreased in Ethanol+PO-60 mg / mL group according to Ethanol group. In addition, SOD, GPx and CAT activities in the kidney tissue of Ethanol group showed a significant decrease compared to the Control group and the GPx activity in all treatment groups increased significantly compared to the Ethanol group. These findings suggest that the administration of the determined infusion doses of the chinar leaves might have protective roles against liver and kidney damage induced oxidative stress by Ethanol in rats.

Key Words: Chinar (*Platanus orientalis* L.), Silymarin, Antioxidant Enzymes and Oxidative Stress, Bioactive Compounds, Rat.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
TABLolar LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oksidatif Stres	3
2.2. Serbest Radikaller	4
2.2.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	4
2.2.2. Hidroksil radikali (·OH).....	5
2.2.3. Süperoksit radikali (O ₂ ^{·-})	5
2.2.4. Singlet oksijen (¹ O ₂).....	5
2.3. Etil Alkol (C ₂ H ₅ OH)	6
2.4. Antioksidanlar	7
2.4.1 Redükte glutatyon (GSH).....	7
2.4.2. Glutatyon peroksidaz (GPx).....	8
2.4.3. Süperoksit dismutaz (SOD).....	9
2.4.4. Katalaz (CAT)	10
2.4.5. Glutatyon S-transferazlar (GST).....	10
2.4.6. Glutatyon redüktaz (GR).....	11
2.5. Silymarin	11
2.6. Tıbbi Bitkiler.....	12
2.7. Çınar (<i>Platanus</i>) Ağacı ve Tıbbi Özellikleri.....	13
2.8. Çınar (<i>Platanus</i>) Ağacı İle İlgili Yapılan Çalışmalar	14
2.9. Araştırmanın Amacı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereç	20

3.1.1. Bitkisel materyal.....	20
3.1.2. Deney hayvanı (Sıçan)	20
3.1.3 Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler	20
3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. İnfüzyon hazırlığı	21
3.2.2. Toksikite testi ve dozların belirlenmesi	21
3.2.3. Deneysel muamele ve grupların oluşturulması	21
3.2.4. Kan ve doku örneklerinin alınması	22
3.2.5. Eritrosit paketinin hazırlanması.....	22
3.2.6. Doku homojenizasyonu	23
3.2.7. <i>İn vivo</i> analizler	23
3.2.7.1. Serum biyokimyasal parametreler	23
3.2.7.2. Malondialdehit (MDA) tayini	23
3.2.7.3. İndirgenmiş glutatyon (GSH) tayini	24
3.2.7.3. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim tayini	25
3.2.7.4. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzim tayini	27
3.2.7.5.Katalaz (CAT) enzim tayini.....	28
3.2.7.6. Glutatyon S-transferaz (GST) enzim tayini	29
3.2.8. <i>İn vitro</i> analizler	30
3.2.8.1. Uçucu bileşiklerin analizi	30
3.2.8.2. HPLC analizi.....	31
3.2.9. İstatistiksel analizler	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER.....	59
EK 1. Etik Kurul Raporu.....	59
EK 2. Tez Orijinallik Raporu	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACT	: Astım Kontrol Testi
ADH	: Alkol Dehidrogenaz
AKH	: Alkolik Karaciğer Hastalığı
ALDH	: Aldehit Dehidrogenaz
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
C₂₅H₂₂O₁₀	: Silymarin
C₂H₅OH	: Etil Alkol
C₂H₆	: Etan
CAT	: Katalaz
CCl₄	: Karbon Tetraklorür
CDNB	: 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen
cm	: Santimetre
Cu,Zn-SOD	: Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz İzoenzimi
CYP2E1	: Sitokrom P450 2e1
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTNB	: 5-5'-Ditiobis 2- Nitro Benzoik Asit
DTNB	: Ellman's Ayıracı
E.C.	: Enzim Kodu
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
Fe	: Demir
Fe-SOD	: Demir Süperoksit Dismutaz İzoenzimi
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
Glu	: Glukoz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz

GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferazlar
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Hb	: Hemoglobin
HCl	: Hidroklorik Asit
HDL_C	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HPLC	: Yüksek Yoğunluklu Sıvı Kromatografisi
HPO₃	: Metafosforik Asit
Ig	: İmmunoglobulin
kDa	: Kilo Dalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LDL_C	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOOH	: Lipid Hidroperoksitleri
M	: Molar
MDA	: 1.1.3.3-Tetra Etoksi Propan
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
Mn-SOD	: Manganez Süperoksit Dismutaz İzoenzimi
N	: Normal
Na₂CO₃	: Disodyum Karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
Na₂SO₄	: Sodyum Sülfat
Na₃C₆H₅O₇	: Sodyum Sitrat
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Beta Nikotinamid Adenindinükleotit Fosfat
NaH₂PO₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat

nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NO	: Nitrik Oksit
·OH	: Hidroksil Radikali
·O₂⁻	: Süperoksit Anyonu
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂	: Oksijen
OD	: Optik Dansite
PO	: <i>Platanus orientalis</i>
PSH	: Bir Proteinin İndirgenmiş Karma Disülfidi
PS-SR	: Bir Proteinin Oksitlenmiş Karma Disülfidi
QR2	: Kuinon Redüktaz 2
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakika Başına Dönüş
SA	: Spesifik Enzim Aktivitesi
SH	: Sülfidril
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSA	: Sülfosalisilik Asit
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TCA	: Triklor Asetik Asit
TFA	: Trifloroasetik Asit
Tris	: Hidroksi Metil Amino Metan
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrad Derece

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Etil alkol metabolizması.....	6
Şekil 2.	<i>Silybum marianum</i> L. (a) ve silymarinin moleküler yapısı (b).....	11
Şekil 3.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in karaciğer dokusu MDA ve GSH seviyeleri.....	37
Şekil 4.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in böbrek dokusu MDA ve GSH seviyeleri.....	38
Şekil 5.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in eritrosit dokusu MDA ve GSH seviyeleri.....	38
Şekil 6.	<i>P.orientalis</i> bitki yaprağı GC-MS sonuçları.....	41
Şekil 7.	<i>P.orientalis</i> yaprağı ekstresinin HPLC profili.....	42

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.	Küvete SOD ayıraçların pipetlenmesi.....	26
Tablo 2.	GPx ayıraçların küvete pipetlenmesi.....	28
Tablo 3.	CAT fosfat tamponun hazırlanışı (pH:7.5)	28
Tablo 4.	CAT tampon ve örneklerin küvete pipetlenmesi.....	29
Tablo 5.	Karışımların küvete alınması ile GST ölçümün yapılması.....	30
Tablo 6.	HPLC analizlerinde kullanılan olan sistemler.....	31
Tablo 7.	HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı.....	31
Tablo 8.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in canlı hayvan ağırlıkları ve sıvı tüketimine etkisi.....	34
Tablo 9.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in biyokimyasal parametrelere etkisi.....	35
Tablo 10.	Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve <i>P.orientalis</i> 'in çeşitli dokulardaki antioksidan enzimlere etkisi.....	40
Tablo 11.	<i>P.orientalis</i> bitki yaprağı GC-MS sonuçları.....	41

1. GİRİŞ

Oksidatif stres; endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikallerin oluşması/oluşturulması sonucu meydana gelebilen, yaşlanma süreçlerinde önemli rol oynayan, kronik hastalık riskini artıran ve ölümcül sonuçları olan karmaşık olaylar dizisidir (Dogan ve ark., 2018). Son yıllarda oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların önlenmesinde, özellikle serbest radikallerin ve antioksidanların rolüne ilişkin kayda değer gelişmeler olmaktadır (Nwozo ve ark., 2012). Bilim insanlarının ve geleneksel terapistlerin, tıbbi bitkilerin kullanımının iyileştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla tıbbi bitkilerin farmakolojik özelliklerinin aydınlatılması ve muhtemel aktif bileşenlerin çıkarılması için çabaları giderek artmaktadır (Ntchapda ve ark., 2014). Yapılan pek çok çalışmada antrakinonlar, flavonoidler, aromatik asitler ve tanenler gibi doğal antioksidanlar polifenollere sahip olan şifalı bitkilerin reaktif oksijen türleri (ROS) süpürücü ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 1994; Dogan ve ark., 2015; Nath ve Yadav, 2015).

Deney hayvanlarında oksidatif stres oluşturulma modellerinde, karbon tetraklorür (CCl₄) (Suzek ve ark., 2016; Dogan ve ark., 2018), siklofosamid (Ali ve ark., 2013) ve etil alkol (Dogan ve Celik, 2012; Bati ve ark., 2015) gibi pek çok kimyasal kullanılmaktadır. Daha önce etanol ile oluşturulan karaciğer hasarının, lipid peroksidasyonunu, protein karbonil oluşumunu, 1-hidroksil etil radikalinin oluşumunu, lipid radikallerinin oluşumunu artırdığı ve karaciğer antioksidan savunma sistemlerinde etkili enzim düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Nwozo ve ark., 2012; Yaylacı ve ark., 2014).

Bugüne kadar tespit edilen 350.000 bitki türü arasında, yaklaşık 35.000 bitki türü tıbbi amaçlı kullanıldığı ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tahminine göre bitkisel ilaçlar; özellikle gelişmekte olan ülkelerin kırsal bölgeleri olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık % 80'i tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar (Kong ve ark., 2003; Tania ve ark., 2016). Türkiye sahip olduğu arazi yapısı ve farklı bitki örtülerinin aynı anda görülmesi sebebiyle bitki türü bakımından zengin bir ülkedir. Türkiye'de şimdiye kadar yaklaşık 10.500 bitki türü tanımlanmış ve bu bitkilerin yaklaşık % 30'nun ise endemik olduğu bildirilmiştir (Doğan, 2015).

Çınar (*Platanus orientalis* L.) (Platanaceae) çok yıllık odunsu bir ağaçtır. Bitki ana kimyasal bileşenleri olarak; proantosiyanidin glikozitlere, flavonol glikozitlere, fenoliklere, karbonhidrat bileşenlerine, yağ asitlerine, fitol türevlerine ve flavonoidlere sahip olduğu bilinmektedir (Tantry ve ark., 2012). Bu maddelerin antioksidan etkili oldukları bilinmektedir.

Bu çalışmada, etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Çınar yaprak infüzyonun kan, karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki olası koruyucu veya toksik etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilere sebep olan etken maddelerin tespitinin yapılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

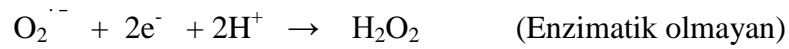
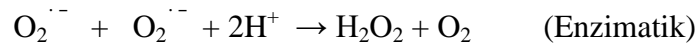
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi veya azaltılmış antioksidan durumu oksidatif stres olarak adlandırılır (Joshi ve ark., 2013). Oksidatif strese sebep olduğu düşünülen reaktif nitrojen türleri (RNS) ve ROS yapılarında eşlenmemiş elektron ihtiva eden ve son derece kararsız olan atom veya moleküllerdir. RNS/ROS hem zararlı hem de yararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Valko ve ark., 2006). Canlı organizmalar, hayatlarını sürdürebilmeleri için oksijen (O₂) ve ROS kullanarak adapte olmuş, çoğalmış ve yeni yaşam formlarının oluşmasına katkıda bulunmuştur (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Gutteridge ve Halliwell, 2018). Oksijene adaptasyon ve indirgenme ara maddeleri, ROS'un ana görevlerini yerine getirmesine izin vermek için özenle düzenlenmiş bu sistem gerekli antioksidan savunmaların eş zamanlı üretilmesine zemin hazırladığı tahmin edilmektedir. Oksidatif stresin belli düzeyde olması karmaşık yaşam formları için önemli görevlerinin yanında, yüksek düzeyi biyomoleküllere zarar verme potansiyeli vardır ve buna “oksidatif hasar veya oksidatif stres” denir (Dogan ve ark., 2017). İnsan hastalıklarında oksidatif hasar ve ROS'un rolünü dikkate alarak “oksidatif stres” terimi: basitçe ROS ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki bir dengesizlik, sinyalleme ve kontrol ve/veya moleküler hasar olarak kullanılır (Gutteridge ve Halliwell, 2018; Sies, 2018). ROS, yüksek konsantrasyonlarda proteinlere, nükleik asitlere ve hücre membran lipitlerine önemli derecede hasar verme potansiyeline sahiptir (Poli ve ark., 2004). ROS'un zararlı etkileri antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanlar etkisiyle dengelenir (Valko ve ark., 2006). Serbest radikallerin kararsız olmaları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli rol oynarlar (Dogan ve Celik, 2012). Oksidatif stres özellikle kanser ve nörodejeneratif Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunur (Halliwell, 2007; Seet ve ark., 2010; Di Domenico ve ark., 2017). Oksidatif strese sebep olan pek çok faktör vardır ancak; literatürde oksidatif stres genel olarak serbest radikallerle ilişkilendirilmiştir. Bu radikaller genel olarak ROS ve RNS kaynaklarıdır.

2.2. Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri (ROS), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve diğerleri hücre metabolizmasına bağlı normal oksidatif süreç sırasında üretilirler (Giorgio ve ark., 2007). Serbest radikaller eksojen (radyasyon, sigara dumanı, stres, ilaçlar, pestisitler ve diğer ksenobiyotikler, çevre kirliliği vb.) ve endojen (mitokondriyal elektron taşıma sistemi, oksijenaz enzimler (ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz), fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar), otooksidasyon reaksiyonları (Fe^{+2} , epinefrin) kaynaklı oluşabildiği gibi biyolojik sistemlerde normal metabolik sürecin işleyişi sırasında da oluşabilirler.

2.2.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikal kaynağını O_2 oluşturur. Önemli serbest radikal kaynaklarından birisi hidrojen peroksittir (H_2O_2). H_2O_2 yapısında paylaşılmamış elektron bulundurmadığı için radikal özelliği olmayan fakat; Cu ve Fe gibi metal iyonlarının varlığında en reaktif ve en zararlı radikal olan hidroksil ($\text{OH}\cdot$) radikalinin öncülü olarak rol oynadığından reaktif oksijen türleri içerisine dahil edilir (Doğan, 2015). Hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumu Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla olur. Hidrojen peroksit, süperoksit radikallerinin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyonu sonucu iki farklı yol ile oluşabilir.



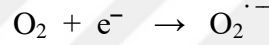
H_2O_2 , *in vitro* modellerde oksidatif stres oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Bai ve ark., 2018). Katalaz (CAT) enzimi H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 dönüştürerek zararlı etkisini ortadan kaldırmaktadır. H_2O_2 tarafından üretilen ROS'lar protein yıkımına, epitel hücre hasarına, lipid zarlarına ve göz lensine kolayca nüfuz ederek ciddi hasarlara neden olmaktadır (Liu ve ark., 2013; Li ve ark., 2013).

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

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) yarılanma ömrü çok kısa, oldukça reaktif ve zararlı olan radikallerin başında gelir. Hidroksil radikali çeşitli atmosfer ve yüzeysel su süreçlerinde önemli rol oynayan (Gonzalez ve ark., 2018) canlı hücre yapılarında fosfolipidler, karbohidratlar, proteinler, DNA gibi elektronca zengin birçok moleküle zarar veren bir radikal türüdür. Hidroksil radikali hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonuna, hücre ölümüne ve DNA üzerinde kırılmalara ve mutajenik etkilere neden olur (Doğan, 2015).

2.2.3. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Serbest radikal olmasına rağmen yüksek derecede reaktif olmayan, O_2 molekülüne bir elektron ilavesiyle $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşan serbest radikal türüdür (Miller ve ark., 1990).



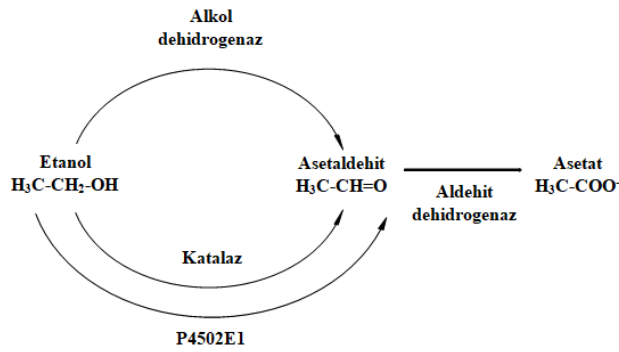
Süperoksitin en büyük kaynağı elektron transport zinciridir. Süperoksitin üretimi çoğunlukla hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşir (Cadenas ve Sies, 1998). Mitokondrinin Elektron Taşıma Sisteminde (ETS) enerji dönüşümü sırasında az miktarda elektron kaçağı olmakta ve bu durum oksijenin $\text{O}_2^{\cdot-}$ serbest radikale dönüşümüne neden olur ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar (Kovacic ve ark., 2005). Süperoksitin önemi, kendisinden bir sonraki basamakta bulunan H_2O_2 kaynağı olmasından kaynaklanır.

2.2.4. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklaşmamış elektronu bulunmadığından radikal olmayan bir reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Bu zıt spinli eşleşmemiş elektronlar aynı yörüngede bulunuyorlarsa delta singlet oksijen, farklı yörüngelerde bulunuyorlarsa sigma singlet oksijen formu oluşur (Perl-Treves ve Perl, 2002). Moleküler oksijen yüksek enerji ile uyarıldığında bu eşleşmemiş elektronlardan biri ya kendi spininin tersi yönünde hareket eder ya da bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçiş yaparak singlet oksijene neden olur. Singlet oksijende eşleşmemiş elektronların spinleri birbirine zıttır.

2.3. Etil Alkol (C₂H₅OH)

Etil alkol (Etanol) doymuş bir hidrokarbon olan etanın (C₂H₆) altı hidrojeninden birinin yerine bir hidroksil grubunun (OH) geçmiş hali olarak tanımlanır. Alkol, alkol dehidrogenaz (ADH) ve aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimleri ile metabolize edilir. ADH, alkolü çok toksik ve kanserojen bir madde olan asetaldehide metabolize ederken bir sonraki adımda asetaldehiti ALDH yardımıyla az aktif bir yan ürün olarak adlandırılan asetata metabolize edilmektedir (Edenberg, 2007). Asetat daha sonra karaciğer dışındaki dokularda karbondioksit ve suya ayrılır (NIAAA, 1997). Alkol vücutta çoğunlukla karaciğer tarafından metabolize edilmekle beraber; beyin, pankreas ve midede de alkol metabolize edilmektedir. Bu dokulara ek olarak, alkol küçük miktarlarda gastrointestinal sistemde asetaldehide metabolize edilir ve bu dokular asetaldehidin zararlı etkilerine maruz kalır (Seitz, 2007). Alkol tüketimi üst solunum yolu, karaciğer, kolon/rektum ve meme kanserleri dahil olmak üzere farklı kanserler geliştirme riskine katkıda bulunabilir (Bagnardi ve ark., 2001). Sitokrom p450 2E1 (CYP2E1) ve katalaz enzimleri alkolü asetaldehide parçaladıkları için alkol metabolizmasında önemli rollere sahiptirler. CYP2E1 enzimi çok miktarda alkol tüketiminden sonra aktifleşirken; katalaz ise vücutta alkolün sadece az miktarını metabolize edebilmektedir (Edenberg, 2007).



Şekil 1. Etil alkol metabolizması

Alkolün küçük bir miktarı yağ asit etil esterleri olarak adlandırılan bileşikler oluşturmak amacıyla yağ asitleriyle etkileşerek uzaklaştırıldığı ve bu bileşiklerin karaciğer ve pankreas hasarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Vonlaufen ve ark., 2007). Alkol CYP2E1 tarafından metabolize edildiğinde ROS oluşumuna sebep olur. ROS; proteinlere ve DNA'ya zarar verebilir veya kanserojenik bileşikler oluşturmak için

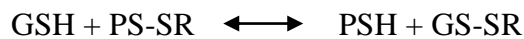
diğer maddelerle etkileşime girebilir (Seitz, 2006). Alkolik karaciğer hastalığı (AKH), dünya çapında kronik karaciğer hastalığının başlıca nedeni olup fibrozise ve siroza yol açmaktadır (Latief ve Ahmad, 2018). Yoğun alkol tüketimine bağlı olarak insanların % 90'ından fazlasında karaciğer yağlanması gelişir ancak; bunların sadece % 20'si ağır alkolik karaciğer hastalığı (AKH) ve siroza dönüşme potansiyeline sahiptir (McCullough, 1998). Küresel mortalitenin yaklaşık % 4'ünü oluşturan AKH dünya genelinde yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (Liu ve ark., 2014). Alkol ile oluşturulan oksidatif stres, etanolün metabolizmasına bağlıdır (Zima, 2001). Yapılan bazı deneysel çalışmalar alkol tüketiminin; lipid peroksidler ve serbest radikallerin oluşumuyla oksidatif stres artışına neden olabileceğini göstermiştir (Yurt ve Celik, 2011; Dogan ve Celik, 2012; Bati ve ark., 2015). Ek olarak, bazı ksenobiyotiklerin tüketilmesi sonucu 1O_2 , H_2O_2 , O_2^- ve $\cdot OH$ gibi serbest radikal (kaynakları) artışıyla beraber dokularda lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Halliwell, 1996).

2.4. Antioksidanlar

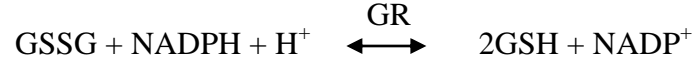
Canlı organizmalar, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücrenin dış yapısında etkili olan koruma mekanizmalarının tümüne antioksidan savunma sistemi denir. Hücre veya dokular fonksiyonlarını normal düzeylerde sürdürebilmek için aşırı üretilen ROS ve RNS'lerin redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon *s*-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve vitaminler savunma sistemlerince nötralize edilirler (Urso ve Clarkson, 2003; Dogan ve ark., 2018).

2.4.1 Redükte glutatyon (GSH)

Hücre için en önemli antioksidan moleküllerinden biri olan GSH, hemen hemen tüm canlı hücrelerde bulunan ve L-glutamat, L-sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir. Diğer bir ifade ile GSH, proteinlerle disülfid değiş-tokuşuna girerek tiyol gruplarının indirgenmiş halde tutulmasını sağlayan bir tripeptittir (Gürdöl, 2016).



PS-SR: Bir proteinin oksitlenmiş karma disülfidi, PSH: Bir proteinin indirgenmiş karma disülfidini göstermektedir. GS-SR, bir flavoprotein olan NADPH-bağımlı glutatyon redüktaz (GR) yardımıyla GSH'e çevrilir. Bu enzim için okside glutatyon (GSSG)'da substrattır.



GSH, metHb reaksiyonunda oluşan H₂O₂ tarafından da GPx'in kataliziyle oksitlenebilmektedir.

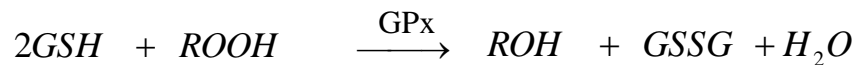
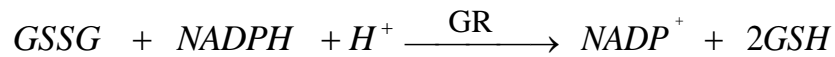


GSH aktif bölgesinde selenyum içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde, H₂O₂ ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir, hücreleri ROS hasarlarından korur ve H₂O₂'yi O₂ ve H₂O dönüştürerek hücrelerden uzaklaştırır (Murray ve ark., 2000; Akbari ve ark., 2018).

GSH, hücrelerde bulunan büyük bir peptid olup yaklaşık olarak karaciğerde 5 mmol/L ve eritrositte 2 mmol/L konsantrasyonlarında bulunmaktadır. GSH sadece antioksidan savunma sistemine katılmıyor aynı zamanda önemli bir sülfidril tampon olup, redükte durumda Hb ve enzimlerde SH-grubunun sürdürülmesini sağlar (Baynes ve Dominiczak, 2009).

2.4.2. Glutatyon peroksidaz (GPx)

GPx (EC 1.11.1.9), 84 kDa molekül ağırlığında ve 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir antioksidan enzimdir. GPx, H₂O₂ ve lipid hidroperoksitleri (LOOH) üzerine etkilidir. GPx aktivitesi selenyuma gereksinim duyan formunda hem H₂O₂ hem de LOOH'u metabolize ederken, selenyuma gereksinim duymayan formu ise sadece LOOH'ları metabolize etmektedir.



Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolunda GR enzimi, GSSG'yi GSH'ye dönüştürmesi için gereken NADPH'ı sağlar (Murray ve ark., 2000). GPx fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önleyen ve eritrositlerde oluşan oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (Kılınç, 1986). Yapılan pek çok deneysel hayvan çalışmasında GPx aktivitesi toksik gruplarda düşerken tedavi ve kontrol gruplarında ise artma görüldüğü rapor edilmiştir (Dogan ve Celik, 2012; Dogan ve ark., 2017; Dogan ve ark., 2018).

2.4.3. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD (E.C. 1.15.1.1), antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturan enzim olup, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalini H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizler. SOD organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir (Gürdöl, 2016).



SOD enzimi hemen hemen bütün aerobik organizmalarda bulunan bir metal enzimdir. İnsanlarda SOD'un aktif merkezinde Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD metal kofaktöre sahip iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD izoenzimi hücre sitozolünde bulunurken, Mn-SOD izoenzim tipi ise hücre mitokondrisinde bulunmaktadır. Bu izoenzimler aynı tepkimeyi katalizlemelerine rağmen aralarında yapısal hiçbir benzerlik bulunmamaktadır (Fridovich, 1995; Perl-Treves ve Perl, 2002). Fe-SOD izoenzimi ise sadece prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunmaktadır. Oksijen kullanımı fazla olan dokulardaki SOD aktivitesi fazla, oksijen kullanımı az olan dokulardaki SOD aktivitesi ise düşüktür (Doğan, 2015). ROS'ların canlılarda oluşturduğu hasarın önlenmesinde SOD ve katalaz enzimleri birlikte iş görmektedir (Süleyman ve ark., 2018). SOD'un katalizlediği tepkime sonunda oluşan H_2O_2 oksijenin toksik türlerinden biridir ve CAT enzimi tarafından birikimi önlenmektedir (Mao, 1993).

2.4.4. Katalaz (CAT)

CAT (E.C. 1.11.1.6) enzimi 240 kDa civarında molekül ağırlığına sahip olup, aktif kısmında dört tane ferrihem grubu (Fe^{3+} protoforfilin) bulunduran bir hemoproteindir. CAT enzimi SOD'a benzer bir dismutasyon mekanizması ile hidrojen peroksiti, H_2O ve O_2 'ye parçalayarak biyolojik sistemleri H_2O_2 'nin zararlarına karşı korurlar (Aebi, 1984; Halliwell ve Gutteridge, 1999). CAT, tüm canlı hücre çeşitlerin peroksizomlarında farklı miktarlarda bulunan bir enzimdir. CAT özellikle karaciğer, böbrek, eritrosit, kırmızı kemik iliği ve mukoz membranlarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Scibior ve Czczot, 2006).



CAT, kataliz etkisini ya H_2O_2 'nin parçalanması (katalitik reaksiyon) şeklinde ya da alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidik reaksiyon) şeklinde gerçekleştirir (Mavelli ve Rotilio, 1984).

2.4.5. Glutasyon S-transferazlar (GST)

GST (EC 2.5.1.18); dimerik yapıda, sitozolde bulunan ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücrel savunmada yer alan, taşıdığı bir elektrofilik merkez ve indirgenmiş GSH ile konjugasyon yoluyla çözünebilir/ayırıştırılabilir bileşiklere dönüştüren, intraselüler bir enzim ailesidir (Mannervik ve ark., 1992; Hayes ve Pulford, 1995). Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GST enzim ailesi, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlerine karşı antioksidan aktivite gösterirler (Nelson ve Cox, 2000; Erat, 2002).



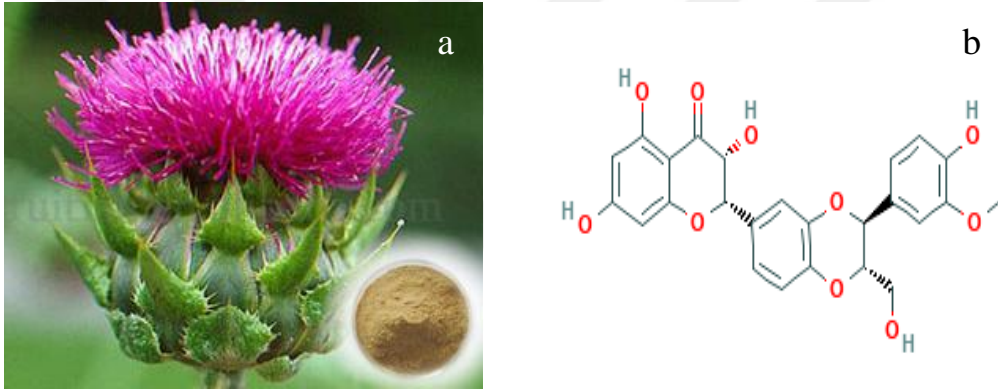
GST'ler GSH içerisinde bazı grupların yer değiştirmesi, yeni grupların eklenmesi ve çıkarılması gibi endojen ve eksojen birçok bileşiğin GSH ile bağlanmasını sağlar (Hollingworth ve Dong, 2008). GST'nin bazı izoenzimleri GPx aktivitesi göstererek LOOH'ların metabolizmasında görev almaktadır (Gürdöl, 2016).

2.4.6. Glutasyon redüktaz (GR)

GR (E.C. 1.8.1.7) enzimi, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında GPx enzimi tarafından yükseltgenen glutasyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çeviren bir enzimdir. GR pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH varlığında organizmada sınırlı miktardaki GSH'ı tekrar kullanıma hazır hale getirmiş olur (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

2.5. Silymarin

Silymarin (C₂₅H₂₂O₁₀), Asteraceae familyasına ait (*Silybum marianum* L.) devedikeni bitkisi tohumlarından elde edilen karaciğer koruyucu bir maddedir.



Şekil 2. *Silybum marianum* L. (a) ve silymarinin moleküler yapısı (b)

Silymarin; başta silibin (% 60) olmak üzere, izosilibin, silikristin, silidianin ve dehidrosilibin izomerlerinden oluşmaktadır (Ding ve ark., 2001; Demartini ve Esposti, 2002). Silymarin karaciğer koruyucu etkisi nedeniyle toksik kimyasallara, alkole bağlı yağ infiltrasyonuna, safra kesesi hastalıklarına, toksin ve mantar zehirlenmelerine, hepatit gibi çeşitli karaciğer hastalıklarında ve yılan/böcek ısırıklarına karşı 2000 yıldan beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Ding ve ark., 2001; Kocaman ve DÖ, 2015). Silymarinin karaciğer dokusunda güçlü detoksifikasyon ve glutasyon (GSH) azalmasına karşı koruyucu etkiye sahip olup lipid peroksidasyonunu engelleme potansiyeline sahiptir. Silymarin, lipoksijenazı inhibe ederek karaciğerde lökotrien oluşumunu engellediği, hepatositlerde protein sentezini arttırdığı, mast hücre stabilizasyonunu sağladığı, tümör öncüllerinin aktivitesini azalttığı, immun fonksiyonları düzenlediği, insan prostat karsinomunda steroid hormonlara bağlı tümörleri inhibe ederek

antianjiojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Miguez ve ark., 1994; Zi ve ark., 1999; Kang ve ark., 2004). Silymarin; etil alkol, karbon tetraklorür, asetaminofen, radyasyon, fenilhidrazin, soğuk iskemisi, aşırı doz demir ve *Amanita phalloides*'in yol açtığı karaciğer kollajen birikimini ve karaciğer hasarını azalttığı belirtilmiştir (Fuchs ve ark., 1997; Abenavoli ve ark., 2010). Benzer şekilde Kocaman ve DÖ 2015 yılında yaptıkları çalışmada silymarinin; antinflamatuar, antiapoptotik, antikarsinojenik, antiviral, antifibrotik ve antianjiojenik özelliklere sahip, iyi tolere edilebildiği ve kullanımının güvenli olduğunu bildirmişler ve silymarinin farklı hastalıklarda da tedavi edici yönleri açısından araştırmalara açık olduğu, gelecek vaat ettiğini rapor etmişlerdir. Luper ise 1998'deki çalışmasında; klinik araştırmalarda tedavi amaçlı kullanılan silymarinin anti-oksidatif, anti-lipidperoksidatif, anti-fibrotik, anti-inflamatuar, bağışıklık sistem güçlendirici ve karaciğer koruyucu etkisi nedeniyle toksik hepatitis, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar, radyasyon toksisitesine ve viral hepatite karşı etkili olduğunu bildirmiştir. Bunların yanı sıra, silymarinin diyabet ve diyabetin sebep olduğu komplikasyonların engellemesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Vessal ve ark., 2010; Marrazzo ve ark., 2011; García-Ramírez ve ark., 2018). Silymarin'in bu olumlu etkilerin yanında bazı literatürlerde gastrointestinal bozukluklar ve allerjik deri döküntüleri şeklinde yan etkileri olduğu belirtilmiştir (Saller ve ark., 2001).

2.6. Tıbbi Bitkiler

Bitkiler, insanoğlunun var olduğu bütün dönemlerde başta ilaç olmak üzere barınak, giyim, gıda, tat ve koku gibi ihtiyaçları karşılamıştır (Gurib-Fakim, 2006). İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalığın (diyabet, sarılık, nefes darlığı vb.) tedavisinde bitkiler denenmiş ve hala bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Eloff, 1998). Antik çağlardan günümüze kadar neredeyse tüm kültür ve uygarlıklar; etkinliği, ekonomikliği, bulunabilirliği, düşük toksisitesi ve kabul edilebilirliği gibi nedenlerle tıbbi bitkileri kullanmışlardır (Coolborn ve Bolatito, 2010). Tıbbi bitkilerin kullanım bilgileri, çeşitli tıbbi sistemlere dayanan yüzyıllar boyunca birikimleri sonucu oluşturulmuştur (Pei SJ, 2001). Dünya çapında yaklaşık 35.000-70.000 arasında bitki türü tıbbi amaçla kullanılmaktadır (Hasan ve ark. 2007). Geleneksel tıp uygulamaları Çin, Hindistan, Japonya, Pakistan, Sri Lanka ve Tayland'da yaygındır (Hamayun ve ark., 2006). Gelişmekte olan bazı ülkelerde, geleneksel tıp sağlık hizmetlerinin temel

dayanağını oluştururken; gelişmiş ülkeler son zamanlarda, bitkisel ilaç ve tedavi içeren geleneksel tıba yönelmişlerdir (Hoareau ve DaSilva, 1999). Geleneksel tıpta yaprak, meyve, kök, gövde, kök ve gövde kabuğu, tohum, çiçek ve lateks en çok kullanılan bitki kısımlarıdır (Muthu ve ark. 2006). Geleneksel tıpta kullanılan tıbbi bitkiler, insan vücudu üzerinde belirli bir fizyolojik etki üreten bazı organik bileşikler içerir ve bu biyoaktif maddeler; tanen, alkaloid, karbonhidrat, terpenoid, steroid ve flavonoid gibi bileşenlerden oluşur (Mann, 1978; Edoğa ve ark., 2005). Platanaceae, Asteraceae, Fabaceae, Apiaceae, Lamiaceae gibi pek çok tıbbi bitki familyaları geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Asadbeigi ve ark., 2014).

2.7. Çınar (*Platanus*) Ağacı ve Tıbbi Özellikleri

Plantanaceae familyası 9 türden meydana gelmektedir, bunlardan 2'si Asya ve Avrupa'da geri kalan türler ise Kuzey Amerika'dan Güney Meksika'ya kadar yayılmış bölgede bulunmaktadır (Carpenter ve ark., 2015). Platanaceae familyasından şifalı bir ağaç olan *Platanus orientalis* Doğu Akdeniz'deki en büyük ve en uzun ömürlü ağaçlarından biridir. Doğu Çınar ağacı olarak bilinen *Platanus orientalis*'e, eski çağlardan beri ilgi ve saygı duyulmuştur (Hajhashemi ve ark., 2011; Rix ve Fay, 2017). Özellikle Türkiye'de bulunan *Platanus orientalis* L., neredeyse bütün ormanlarda, akarsu ve nehir diplerinde doğal olarak bulunur. Bunlar; 5 metreden fazla bir çapa ve 25-35 metre uzunluğa sahip, 2000 yıl boyunca yaşayabilen uzun ömürlü ağaçlardır. Gövde ve dallar açık gri veya yeşilimsi gridir. Gövde beyazımsı gri bir kabuk ile kaplıdır. Eski gövde kabukları küçük plakalar halinde dökülür. Açık yeşil renkli yaprakları 5-7 loblu, büyük dişli ve tüsüzdürler. Yaprak sapı oldukça uzundur ve boyu 3-8 cm arasında değişir. Meyveler küre şeklinde, bileşik ve 2-6 tanesi uzun bir yaprak sapında bulunur (Davies, 1982; Gilman ve Watson, 1994; Mataraci, 2002; Anşin ve Özkan, 2006). Doğu Çınar ağacının odunları; kutu, sepet, mobilya, kontrplak, kağıt üretimi, kömür endüstrisinde kullanılmaktadır (Fao, 1986; Gilman ve Watson, 1994). Bununla birlikte bitkinin yaprak (Tanrıy ve ark., 2012), tohum (Janković ve Dodevski, 2018), meyve (Chatzigeorgiou ve ark., 2017) ve diğer organları tıbbi açıdan değer taşımaktadır. Bitki ana kimyasal bileşenler olarak; proantosiyanidin glikozidleri (Nishanbaev ve ark., 2004; Nishanbaev ve ark., 2005; Nishanbaev ve ark., 2010), flavonol glikozitleri (El-Alfy(a) ve ark., 2008), fenolik maddeler (Kaouadji, 1990;

Mitrokotsa ve ark., 1993; El-Alfy(b) ve ark., 2008), karbonhidrat bileşenlerini (Khodzhaeva ve ark., 1995), yağ asitlerini (Khidyrova ve ark., 1995), fitol türevlerini (Abdullaev ve ark., 1994) ve flavonoidleri (Kaouadji, 1986; Kaouadji, 1989;) içerir (Haider ve ark., 2012). Bitkiden elde edilen bu bileşikler farklı hastalıkların tedavisinde doğrudan veya dolaylı olarak kullanılırlar (Mitrocotsa ve ark., 1999). Eski dönemlerde halk hekimliğinde *Platanus orientalis* diş ağrılarına ve dizlerdeki ağrı ve iltihaplanmalara karşı ağrı kesici olarak kullanılmıştır (Ebn-e-Sina, 1988; Tonekaboni, 2007). Ayrıca halk hekimliğinde Çınar ağacının yaprakları yara iyileştirici ve oftalmolojik bir ajan olarak kullanılırken; kökler hemostatik bir ajan ve yılan ısırığında antivenom olarak; kabuklar diüretik ve diyarede kullanıldığı bilinmektedir (Tuzlacı ve Erol, 1999; Nishanbaev ve ark., 2004; Lizzio, 2014). Yapılan bazı araştırmalarda Doğu Çınar ağacının antikanser (Tantry ve ark., 2012), anti-inflamatuar ve antinosiseptif aktiveleri ve ülserojenik risk değerlendirilmesi (Haider ve ark., 2012), ses kısıklığı ve astımda etkileri (Asadbeigi ve ark., 2014) ve yaşlanma karşıtı olarak kullanılması (Chatzigeorgiou ve ark., 2017) araştırılmıştır. Bu etkilerin yanında bitkinin ağır metallerle meydana gelen kent kirliliğine karşı verdiği tepkiler ve çevre kirliliğini nasıl temizlediği de araştırılmıştır (Pourkhabbaz ve ark., 2010; Khosropour ve ark., 2017).

2.8. Çınar (*Platanus*) Ağacı İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Çınar ağacına ait yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Tantry ve ark. (2012), Çınar (*Platanus orientalis* L.) yapraklarından hazırlanan etanolik ekstraktının etilasetat ve n-bütanol fraksiyonlarından elde edilen sekiz adet açılınmış flavonol glikozit bileşimini 2D NMR teknikleri dahil olmak üzere NMR ile karakterize etmişler. Sonuç olarak izole edilen bileşikler; nükleer faktör kappa B (NF-κB), nitrik oksit (NO), aromataz ve kuinon redüktaz 2 (QR2) ile kanser önleyici aktiviteleri için değerlendirilmiş ve bunlardan bazılarının az da olsa aktif olduğunu belirtmişler.

Haider ve ark. (2012), *Platanus orientalis* Linn.'den hazırlanan etanolik ekstrakt ve onun çeşitli fraksiyonları karragenan tarafından oluşturulmuş arka pençe ödemindeki anti-inflamatuar aktiviteleri için 100 mg/kg *P.orientalis* ve 200 mg/kg *P.orientalis* dozları verildikten sonra kloroform fraksiyonu 3 saat sonra standart ibuprofen (% 6.66)

ile karşılaştırılmış ve 200 mg/kg *P.orientalis* iyi bir inhibisyon (% 68.33) ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. 200 mg/kg *P.orientalis* dozu analjezik aktivitesi etanolik ekstrakt ve tüm fraksiyonları (özellikle kloroform), standart ibuprofen ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde analjezik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Mide ülseri çalışmalarını ise 600 mg/kg dozunda ülserojenik risk değerlendirmesi incelenmek üzere gerçekleştirmişlerdir ve önemsiz derecede ülserleşme meydana geldiğini belirtmişlerdir. Etanolik ekstrakt ve fraksiyonlarının histopatolojik sonuçlarının ülserle neden olmadığı aksine anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif aktiviteleri olduğu ortaya konulmuştur.

Dimas ve ark. (2000), *Platanus orientalis* L. tomurcuklarından hazırlanan metanolik ekstraktında izole edilen platanoside ve tiliroside'in insan lösemik hücre dizilerinde *in vitro* sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Platanoside, test edilen hücre dizisinin çoğuna karşı sitotoksik aktivite sergilerken; tiliroside, test edilen dokuz hücre dizisinin ikisine karşı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Butt ve ark. (2015), Kuzey Pakistan'da yılan ve akrep ısırığı tedavisinde bitkilerin etnomedikal kullanımı üzerine yaptıkları çalışmada; 40 aileye ait toplam 62 adet tıbbi bitkinin yılan ve akrep ısırığına karşı kullanıldığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, *Platanus orientalis* L.'nin yılan ve akrep ısırığına karşı kullanılan bitkilerden biri olduğunu ve bölgenin tıbbi bitkileri üzerinde yapılacak olan fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda kullanılacak değerli geleneksel bilgileri korumak için etno-tıbbi belgelerine odaklanma önerisinde bulunmuştur.

Asadbeigi ve ark. (2014), Urmia'da 10 tıbbi bitki ailesinden 20 şifalı bitkinin solunum rahatsızlıklarını tedavi etmek için kullanıldığı bilgisine yer verildiği çalışmada; solunum hastalıklarının tedavisinde en çok kullanılan bitki kısmının tohum (% 27) yöntemin ise kaynatma (% 54) olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında *Platanus orientalis* L. kabuklarının kaynatılarak ses kısıklığı ve astımda kullanıldığı bilgisine yer vermişlerdir.

Stoop ve ark. (1996), bitkilerde mannitol metabolizmasının stresle başa çıkma özelliklerinden yola çıkılarak; *Platanus orientalis* ve diğer bitkilerde bulunan mannitolun tuz ve ozmotik strese karşı uygun bir çözücü olduğunun belirtildiği

çalışmada; patojen saldırılarına karşı bitki tepkilerinde rol aldığını ve bu avantajlara bağlı olarak mannitol metabolizması, hem biyotik hem de abiyotik strese karşı bitki tepkilerinde rol alabileceğini ortaya koymuşlardır.

Pazouki ve ark. (2009), *Platanus orientalis* polenlerinden kütle spektrometresi ile yeni bir alerjen olan siklofilini tanımladıkları çalışmada, *Platanus aserifolia* alerjisi üzerine yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen, *Platanus orientalis* ağaçlarından elde edilen polen alerjenlerinin moleküler karakterizasyonu hakkında herhangi bir bilginin bulunmadığı ve çalışmada *P. orientalis* polen ekstresinin IgE reaktivitesinden kısmen sorumlu olan 18 kDa moleküler ağırlığına sahip siklofilin ailesinin yeni tanımlanmış bir üyesini tespit etmişlerdir.

Bastos ve ark. (2007), betulinik ve betulonik asitlerin mantarlar tarafından biyotransformasyonunu araştırdıkları çalışmada; birçok bitki türünde bulunan bir triterpenoid olan betulinik asit ve yakın ilişkili olan betulonik asit, anti-kanser ve anti-HIV gibi aktivitelere sahiptirler. Mısır yapraklarından *Colletotrichum* ile birlikte *Platanus orientalis* kabuğundan izole edilmiş; *Artanroturys*, *Chaetophoma* ve *Dematium* mantarları tarafından her iki bileşikte tek tek metabolize edilmiştir. Sonuç olarak bu mantarların C-3, C-7, C-15, C-25 ve C-30 pozisyonlarında lupan substratlarının yavaş ve seçici oksidasyonu için faydalı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mirsadraee ve ark. (2018), rutin tedavilere dirençli astım hastalarında *Rosmarinus officinalis* ve *Platanus orientalis* ekstrelerinin etkilerini araştırdıkları çalışmada; üç farklı gruptaki deneklere ekstreleri tek başına veya kombinasyon halinde vermişlerdir. Astım Kontrol Test (ACT) değeri, *R. Officinalis* ile yapılan tedaviden sonra önemli gelişme gösterdiği, *R. officinalis* grubunda öksürük, balgam üretimi ve hırıltıda iyileşme olduğunu gösterirken; *P. orientalis* grubunda ise sadece öksürük ve göğüsteki sıkışmada iyileşme olduğunu göstermişler. *R. officinalis* ekstraktı dirençli astım tedavisinde ümit verici sonuçlar verirken bu bitkisel ilaçların etkili bileşenlerini bulmak için ileri çalışmalar yapılmasını tavsiye etmişlerdir.

Dönmez (2018), Kocayemiş ağacı (*Arbutus andrachne* L.) ve Doğu Çınarı (*Platanus orientalis* L.) ağaçlarından lipofilik ve hidrofilik ekstraktifler üzerine yaptığı çalışmada; toplam lipofilik ekstrakt miktarı *A. andrachne* ağacında 3,39 mg/g, *P.*

orientalis ağacında ise 16,91 mg/g olarak saptamıştır. *A. Andrachne*'deki toplam hidrofilik ekstrakt miktarı daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Yağ asitleri her iki ağaç türünde lipofilik ekstraktlarda baskın grup olarak tespit etmiştir. *A. andrachne* ağacında (0,17 mg/g) 18:3 ve *P. orientalis* ağacında (0,19 mg/g) 16:0 oranında olmak üzere en yüksek yağ asitlerine sahip olduğunu belirlemişler.

Saraçoğlu (2018), Çınar yaprağında bulunan flavonoidler, proantosiyanidin glikozitler, penta-aromatik triterpenoidler, tannin, fitol türevleri ve kafeik asit gibi aktif bileşiklerin geleneksel tedavide osteoartrit, gut ve antidepresan gibi olumlu etkileri olduğunu bildirmiştir.

Hoshika ve ark. (2014), ozona maruz kalan yaprak döken ağaç türlerinde stoma tembelliğinin belirlenmesini konu alan çalışmada; Fideler büyütülmüş ve üstü açık bölmelerde üç düzey ozona (42, 69, 100 nmol mol⁻¹ ortalama gün ışığı, (09:00'dan 18:00'a) maruz bırakılması sonucunda; stoma ozon akışının kısıtlanması, *P. orientalis*'te ozon kaynaklı tembelliği azalttığını belirtmişlerdir.

Janković ve ark. (2018), karbon yakalama ve depolama teknolojisinde uygulanması amacıyla ham ve pirolize Çınar ağacı tohum (*Platanus orientalis* L.) örneklerinin tanımlanması üzerine yaptıkları çalışmada; tahribatsız analitik yöntem Çınar ağacı tohumlarının karbon açısından zengin bir hammadde olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, karbonlaştırma sonucu oluşan madde ileri aktivasyon işlemi için çok iyi özelliklere sahip olduğunu gösterirken, Çınar ağacı tohumunun karbon yakalama ve depolama uygulamasında iyi bir aday olabileceğini belirtmişlerdir.

Khosropour ve ark. (2017), ağır metallerin neden olduğu kentsel kirliliğe karşı *Platanus orientalis* yapraklarının tepkisinin araştırdığı çalışmada; kentsel kirliliğin Çınar (*Platanus orientalis* L.) yapraklarında fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik özellikleri üzerindeki etkisi incelemişlerdir. Kentsel alan yapraklarında süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve guaiacol peroksidaz aktiviteleri daha yüksek olduğunu ve bu enzim aktivitelerindeki artışın, ağaçların kirliliğe bağlı stres nedeniyle artan reaktif oksijen türleri (ROS) ile baş etmeye çalıştıklarını ve Doğu Çınar ağaçlarının kirliliğin bir kent ortamında yaşarken fizyolojik ve anatomik özelliklerini değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Lizzio (2014), Pakistan’da tedavi olarak kullanılan şifalı bitkilerin kantitatif etnobotanik araştırmasında bölgede bulunan 48 farklı insan rahatsızlığına karşı alınan 50 aileden toplam 92 bitki türü rapor etmiştir. Yayımladığı çalışmada bölgede Çınar olarak bilinen *Platanus orientalis* bitki kabuğunun diyare ve diş ağrısında kullanıldığını bildirmiştir.

Majeed ve ark. (2018), bitkilerin farklı organlarını ve antimikrobiyal uygulamalarını kullanarak gümüş nanopartiküllerin uygun maliyetli biyosentezi amacıyla yaptığı çalışmada *Platanus orientalis* yaprak ekstraktının gümüş nanopartikül üretiminde kullanıldığını bildirmiştir.

Barış Özel ve ark. (2015), taşıtların neden olduğu ağır metal kirliliğinin etkilerini belirlemek için Doğu Çınarı (*Platanus orientalis* L.) yapraklarında yaptıkları çalışmada; Türkiye’de Bartın ve Karabük illerini bağlayan D-755 Karayolu’nda araç trafiğinin yol açtığı ağır metal analiz sonuçlarının Doğu Çınar ağaçlarının yapraklarındaki epidermis hücrelerinde 1.5-4.7 µm boyutlarında yaralanmalara sebep olduğunu ve bu yaralanmaların sonraki dönemlerde 10.2-14.7 µm seviyelerine ulaştığını tespit etmişlerdir.

Chatzigeorgiou ve ark. (2017) *Platanus orientalis* meyvelerinden anti-aging aktiviteye sahip doğal ürünlerin izolasyonu üzerine yaptıkları çalışmada; İleri fitokimyasal yöntemler kullanarak *Platanus orientalis* meyvelerinden doğal ürünler izole etmişlerdir ve bunları *Drosophila flies* ve normal insan fibroblastlarında etkilerini araştırmışlardır. *Platanus orientalis* meyvesinden elde edilen fenoliklerle zenginleştirilmiş metanol ekstraktının *Drosophila flies* türünde diyet uygulamasının antioksidan etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Proteostatik mekanizmalarını aktifleştirip, sineklerin ömrünü biraz uzatmıştır. Daha sonra ekstraktın iki ana bileşimini (Platanoside ve Tiliroside) izole ederek bu bileşikler ile toplam ekstrenin zenginleştirilmesinin oksidatif stresi azalttığını ve (Tiliroside zenginleştirilmiş ekstrakt durumunda) proteostatik mekanizmaları aktive ettiğini gözlemlemişlerdir. Sineklerde saflaştırılmış Tiliroside uygulaması; proteostatik genleri aktive ettiği, proteazom ve lizozomal-katepsin aktivitelerini arttırdığı ve dokuların oksidatif yükünü azalttığı; ayrıca, sineklerin hareket aktivitesinde yaşa bağlı azalışını geciktirdiği ve sineklerin ömür uzunluğunu arttırdığını belirtmişler. Özellikle, Tiliroside normal insan fibroblastlarında

proteazomu aktifleştirerek hücreyel yaşlanmanın ilerlemesini geciktirdiği, bu da insan hücrelerinin yaşlanma oranını etkileyebileceğini rapor etmişler. Kısacası, bu çalışmada *P. orientalis* meyvelerinden elde edilen doğal ürünlerin potansiyel yaşlanma karşıtı aktivitesini vurgulamışlardır.

Mahvi ve ark. (2007), sulu çözeltiden kadmiyumun (Cd) uzaklaştırılmasında *Platanus orientalis* yapraklarının etkili olduğunu göstermişlerdir.

Tuzlacı ve Erol (1999), altmışaltı (66) şifalı bitki türünün raporlandığı çalışmada; ınar (*Platanus orientalis*) bitki gövde kabuklarının dekoksasyonu diüretik olarak kullanıldığını bildirmişlerdir.

2.9. Araştırmanın Amacı

Son zamanlarda ınar yaprağının kireçlenme problemlerine karşı halk tarafından çokça tüketildiği bilinmektedir. Kireçlenme amaçlı kullanılan bu yaprağın çeşitli dokular üzerinde olası etkilerin belirlenmesi önemli olacaktır. Daha önce bazı çalışmalarda *Platanus orientalis* L. metanolik yaprak ekstresinin halk sağlığında yara iyileştirici, anti-inflamatuar, analjezik etki, göz sinir hastalıklarına ve mide ülserine karşı koruyucu etkisi; ınar kökünün kan dengeleyici ve yılan ısırıklarına (zehir) karşı önemli koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak baktığımız anlamda sistematik çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu sebeple ilk defa bu çalışmada halkın bu yaprağı tüketim şeklinden yola çıkılarak ortaya konması önemli olacaktır. Bu nedenle, etanol ile deneysel oksidatif stres oluşturulan sıçanlara farklı konsantrasyonlarda ınar yaprağı infüzyonu uygulanması sonucu kan, karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan savunma enzim düzeylerinde ve serumda biyokimyasal parametrelerde meydana getirdiği değişimlerin silymarin gibi karaciğer koruyucu ve iyileştirici etkisi bilinen bir madde ile karşılaştırılarak bu bitkinin hangi dozlarda tüketilmesi gerektiği, olası koruyucu veya toksik etkilerinin ortaya konulacak olması hem yöre halkı hem de bilim dünyasına önemli katkı sunacağı kanaatindeyiz.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bitkisel materyal

Çınar (*Platanus orientalis* L.) bitkisi yaprakları 2017 yılı Ağustos ayı Mardin ilinin Dargeçit ilçesi Hacı Hamza köyünden toplandı. Toplanan yaprak örnekleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra güneşten korunarak gölgede kurutulmaları sağlandı. Çalışma öncesi hazırlıkta, kuruyan yaprak numuneleri kaba toz haline getirildi ve çalışma zamanına kadar -20 °C'de difirizde muhafaza edildiler. Toplanan örneklerin teşhisi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalında görevli Dr. Öğr. Üyesi Abdullah DALAR tarafından teşhis edildikten sonra herbaryum örneği (Herbaryum No:340 ve Toplayıcı No: A.D-761) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda saklandı.

3.1.2. Deney hayvanı (Sıçan)

Çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 1,5-4 aylık, 100-350 g ağırlığındaki 30 adet erkek sıçan (*Wistar albino*) kullanıldı. Sıçanlar 25±2 °C oda sıcaklığında 14 saat aydınlık/10 saat karanlık ışık periyodunda standart plastik kaplarda *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı.

3.1.3 Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler

WiseMix VM-10 vorteks, ISOLab LS-EJ-320AB hassas terazi, NÜVE NF 1200R soğutmalı santrifüj, JSWB-22T sıcak su banyosu, WTW İnoLab pH 7110 Ph metre, Blender, Eppendorf plus mikro pipet, Vestel derin dondurucu, Wisecryo difiriz (-80 °C), AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometre, Ultrasonik homojenizatör (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany), Kross saf su cihazı, Falkon 50 mL plastik tüp, enjektör, EDTA'lı ve Biyokimya tüpleri, makas, plastik süzgeç, neşter, jilet, kurutma kağıdı.

3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Silymarin (Sigma, SO292-50G), Bovin serum albumin (Sigma, A2153-10G), Etil alkol (Sigma, Cas no:64-17-5), Süperoksit dismutaz (SOD) enzim kiti (Ransod, SD125), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim kiti (Ransel, RS504), Redükte glutasyon (GSH), Okside glutasyon (GSSG), Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), Tiyobarbitürik asit (TBA), 1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), 5-5'-Ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), Hidroksi metil amino metan (Tris), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum sülfat (Na_2SO_4), Beta Nikotinamid Adenindinükleotit fosfat (NADPH), Metafosforik asit (HPO_3), Triklor asetik asit (TCA), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), Sülfosalisilik asit (SSA), disodyum karbonat (Na_2CO_3), Etanol, Ketamin (%10 luk).

3.2. Yöntem

3.2.1. İnfüzyon hazırlığı

Toz haline getirilen numuneler kaynamakta (100°C) olan suda yaklaşık 2 dakika bekletildikten sonra ısıtma işlemi durduruldu ve yaklaşık 15 dakika sonra pellet bir tülbent ve ardından da enjektör yardımı ile $0.45\ \mu\text{m}$ 'lik hidrofilik filtreden (Millipore) geçirilerek içirilecek sıvı hazırlandı.

3.2.2. Toksikite testi ve dozların belirlenmesi

Toksikite testi için kullanılan 6 adet *Wistar albino* ırkı erkek sıçana 24 saatte bir (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 g/100 mL su, infüzyon) düşük dozdan yüksek doza doğru *ad libitum* verilerek olası toksik etkiler yaklaşık bir hafta boyunca gözlemlendi. Test sonucunda herhangi bir ölüm veya toksik bulguya rastlanmadı. Buna göre ana çalışmada kullanacağımız iki farklı dozu 20 mg/mL ve 60 mg/mL olarak belirledik.

3.2.3. Deneysel muamele ve grupların oluşturulması

Deneysel çalışmada kullanılan 30 adet *Wistar albino* ırkı erkek sıçan her grupta 6 sıçan olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu.

(I) Kontrol grubu: Normal yem + çeşme suyu verilen grup,

(II) Etil alkol grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu verilen grup,

(III) Etil alkol + Silymarin grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu+ Silymarin (10 mg/kg/gün) ile beslenen grup,

(IV) Etil alkol + *Platanus orientalis* (PO-20 mg/mL) grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu+ PO-20 mg/mL yaprak infüzyonu ile beslenen grup,

(V) Etil alkol + *Platanus orientalis* (PO-60 mg/mL) grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu+ PO-60 mg/mL yaprak infüzyonu ile beslenen grup.

Otuz gün sürdürülen deneyde sıçanların *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Deney boyunca sıçanların haftalık canlı ağırlık, yem ve sıvı tüketimi hesaplandı.

3.2.4. Kan ve doku örneklerinin alınması

Otuz günlük deneme sonunda sıçanlar % 10'luk ketamin ile anestezide tutularak enjektörler yardımıyla kalplerinden kan alındı. Kanlar EDTA'lı ve biyokimya cam tüplere alındı. EDTA'lı kan eritrosit paketi için kullanılırken, Biyokimya tüplerindeki kan ise serumda bakılması gereken parametreler için kullanıldı. Karaciğer ve böbrek dokuları serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) su ile yıkandıktan sonra sıvı azot içine alınan dokular -80 °C'de defirizde saklanmaları sağlandı.

3.2.5. Eritrosit paketinin hazırlanması

EDTA'lı cam tüplere alınan kan 3000 rpm'de +4°C'de soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan plazma atıldı. Altta kalan hacme eşit oranda serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin yıkama işlemi gerçekleştirildi. Serum fizyolojik eklenen tüpler bu sefer 2000 rpm'de +4 °C'de 8 dakika santrifüj edildi. Her seferinde yukardaki işlem tekrarlanarak eritrosit yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. En sonunda soğuk su ile eritrositlerin patlatılması sağlandı ve elde edilen eritrosit paketi (-80°C) defirize konularak muhafaza edildi. Analizlere geçildiğinde antioksidan enzimlerden MDA ve GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px, GST ve CAT enzim aktivitelerine bakıldı.

3.2.6. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda (-80 °C) bekletilen sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak buz üzerinde çözümleri sağlandı. Ekstraksiyon için 1mmol/L EDTA ve 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.4) içeren tampon kullanıldı (Dogan ve ark., 2018). 500 mg doku üzerine 5 mL soğuk tampon eklendi. Dokular cam bagetle iyice ezilerek Ultrasonic Processor homojenizatörde (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany) 3 dakika homojenize edildi. Ekstrakt hemen +4 °C'de 30 dakika 9500 rpm'de santrifüj edildi. Karaciğer ve böbrek dokusundan elde edilen berrak süpernatantlar hedeflenen parametre süpernetantlarında belirlenen enzim tayinleri için kullanıldı.

3.2.7. *In vivo* analizler

3.2.7.1. Serum biyokimyasal parametreler

Serumda Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH), Alkalen fosfataz (ALP), Gama glutamil transferaz (GGT), Glukoz (Glu), Üre, Ürik asit, Kreatinin, Total bilirubin, Albumin, Trigliserit, Kolesterol, Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL_C) ve Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL_C) (ARCHITECT 16200, Abbott park, IL 60064 USA) otoanalizatör cihazında Abbott biyokimya kitlerinde fotometrik olarak bakıldı.

3.2.7.2. Malondialdehit (MDA) tayini

Prensip: Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid, tiyobarbitürik asit ile renkli forma girmesi ile ölçüldü (Jain ve ark. 1989).

Ayırıcılar

- 1.EDTA Çözeltisi (0.1 M) : 37.224 g EDTA-Na₂H₂O 1 litre distile suda eritilir.
- 2.BHT Çözeltisi (% 88) : 0.220 g BHT 25 mL mutlak alkolde çözdürülür.
- 3.NaOH Çözeltisi (0.05 N) : 2 g NaOH 1 litre distile suda eritilir.
- 4.TBA Çözeltisi (% 1) : 1 g TBA 100 mL'ye 0.05 N NaOH ile tamamlanır.
- 5.TCA (% 30) : 30 g TCA 100 mL distile suda eritilir.
- 6.Fosfat Tamponu : 8.1 g NaCl, 2.302 g Na₂HPO₄, 0.194 g NaH₂PO₄ distile suda eritilerek 1 litreye tamamlanır (pH 7.4).

Deneyin yapılışı: Lipid peroksidasyon ürünü MDA seviyesi, TBA reaktifi ile renk reaksiyonu sonucu AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometrede 532 nm'de absorbansta ölçüldü. Bir tüpe ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş eritrosit paketi veya doku süpernatantlarından 200 µL alınarak üzerine 800 µL fosfat tamponu ve 25 µL BHT ile süspanse edildi. Sonra 500 µL % 30'luk TCA eklendi. Tüpler vortekslenerek 2 saat -20 °C'de buzdolabında tutuldular. Sonra 15 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildiler. Süpernatantların 1 mL'si alınarak başka tüpe aktarıldıktan sonra tüplerin üzerine 75 µL EDTA ve 250 µL TBA eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra 15 dakika sıcak su banyosunda (90 °C) tutuldu. Sonra oda ısısına getirilerek 532 nm'de optik dansiteleri (eritrositlerde 532 nm OD den 600 nm OD çıkartılarak hemoglobindeki MDA miktarı ortadan kaldırıldı) okundu (Jain ve ark., 1989).

$$A = a \times b \times c$$

$$A = \text{Absorbans} \quad a = \text{Ekstinksiyon katsayısı}$$

$$b = \text{Işık yolu} \quad c = \text{Konsantrasyon}$$

$$1. \text{Sulandırma} : 0.2 + 0.8 + 0.025 + 0.5 = 1.525 / 0.2 = 7.625$$

$$2. \text{Sulandırma} : 1 + 0.075 + 0.25 = 1.325 / 1 = 1.325$$

$$\text{Sonuç} = 7.625 \times 1.325 = 10.103125 = F$$

$$c = A/a \times b = (A/\text{mol} \times \text{cm}) / (1.56 \times 10^5 \times \text{lt}) \times (1/\text{cm}) \times (10^9 \text{ nM}/\text{mol}) \times (\text{lt}/10^3 \times \text{mL})$$

$$c = A \times 1 \times F \times 10 / 1.56 = \text{nmol/g protein doku olarak hesaplandı.}$$

3.2.7.3. İndirgenmiş glutatyon (GSH) tayini

Prensip: Gerekli işlemlerden sonra eritrosit paketinden hazırlanan örneklerde, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. İndirgenmiş glutatyon (GSH), elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu sonucu sarı rengin oluşumu ile ölçüldü. Eritrosit dokusunda GSH seviyesinde düşüş olabileceği ihtimaline karşılık GSH okunması 24 saat içerisinde gerçekleştirildi. Karaciğer ve böbrek doku süpernatantlarında ise çöktürücü kullanılmadı fosfat tamponu eklenmesi aşamasındaki sıra takip edildi (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988; Dogan ve Celik, 2012).

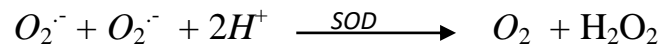
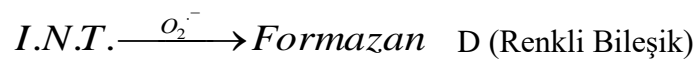
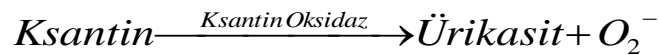
Ayrıraçlar:

1. Çöktürücü Çözelti: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl 100 mL distile suda eritilerek çözdürüldü.
2. Fosfat Çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat, distile su ile hazırlandı.
3. DTNB (Ellman's Ayracı): 40 mg DTNB, % 1 sodyum sitrat, 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Deneyin yapılışı: EDTA'lı tüm kandan 200 µL alındı. Üzerine 1.8 mL distile su eklenerek, hemoliz gerçekleştirildi. Daha sonra 3 mL çöktürücü çözelti ile hemolizat karıştırarak 5 dakika beklendi. Sonra karışım kurutma kağıdında süzüldü. Örnek numuneden elde edilen süpernatantın 2 mL'si başka tüpe aktarıldı. Tüpün üzerine 8 mL fosfat çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra sıcak su banyosunda 60 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra çıkarıldı, oda ısısına geldikten sonra 1 mL DTNB ayırıcı tüpe konuldu. Standart için, 1mM GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Karaciğer ve böbrek doku süpernetantlarından ise 1 mL alındı üzerine 5 mL fosfat çözeltisi eklenerek vorteksleme işlemi gerçekleştirildikten sonra sıcak su banyosunda 60 °C'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra çıkarılan örnekler oda ısısına gelmeleri sağlandıktan sonra 1 mL DTNB ayırıcı tüpe konuldu ve AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Sonuçlar dokular için µmol/mg protein doku olarak hesaplandı (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988; Dogan ve Celik, 2012).

3.2.7.3. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim tayini

Prensip: SOD ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksit radikali, 2-(-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klörür (INT) ile kırmızı boya formuna dönüşmesi reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmesi prensibine dayanır (McCord ve Fridovich, 1969).



Ayrıçlar	Konsantrasyonları
1.Karışık Substrat	
Ksantin	0.05 mmol/l
I.N.T.	0.025 mmol/l
2.Tampon	
CAPS	40 mmol/l pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/l
3.Ksantin Oksidaz (XO)	80 U/l
4.Standart	5.70/mL

Deneyin yapılışı: SOD enzim aktivitesi Radox-Ransod enzim kiti ile AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometrede 505 nm'de 37 °C'de ölçüldü (Radox Lab., 2018). Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı. Eritrosit paketinden 10 µL alınarak 2500 µL 0.01 M fosfat tamponu (pH = 7.0) ilave edilerek 251 katı sulandırıldı (F=251). İnhibisyonun % 30-60 arası olması sağlandı. İçerik çizelge 3.1'teki gibi karıştırılarak ilk absorbands A₁ 30 saniye sonra okundu ve eş zamanlı olarak zaman başlatıldı. Son absorbands A₂ 3 dakika sonra okundu.

Hesaplama: Spektrofotometreden alınan optik dansite sonuçları aşağıdaki denklemde yerine konarak SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{StdDk} \times 100)}{(\Delta A_{BlankDk})} = \% \text{ İnhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{ÖrnekDk} \times 100)}{(\Delta A_{BlankDk})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

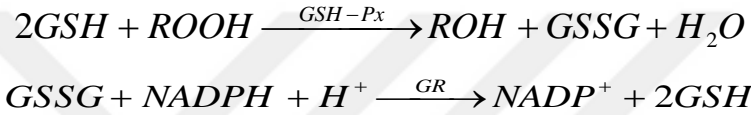
Tablo 1. Küvete SOD ayrıçların pipetlenmesi

	Standart S1	Standart S2	Örnek	kontrol
Sulandırılmış Ransod Ör.	15 µL	-----
Standart	-----	15 µL	----	----
Suland Ör.	-----	-----	15 µL	----
Sulandırılmış Kontrol	-----	-----	-----	15 µL
Karışık Substrat (R1)	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Ksantin Oksidaz (R2)	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL

SOD enzim aktivitesinin hesaplanması için standart grafiği elde edildi. Standart grafikten elde edilen $y = 0,0498x - 1,351$ ($R^2=0,7246$) formülü ile sulandırma faktörü de hesaba katılarak SOD aktivitesi U/g protein doku olarak hesaplandı.

3.2.7.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim tayini

Prensip: Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksitin GSH varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutasyonun formu GSSG, GR ve NADPH varlığında NADPH'ın $NADP^{+}$ ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir (Paglia ve Valentine, 1967).



Ayıraçlar

Konsantrasyonları

1.Ayıraç (R1a)

Glutasyon

4.0 mmol/l

G. Redüktaz

≥ 0.5 U/l

NADPH

0.34 mmol/l

2.Tampon (R1b)

Fosfat

0.05 mol/l pH 7.2

EDTA

4.3 mmol/l

3.Kümen Hidroperoksit (R2)

0.18 mmol/l

4.Sulandırma Ayıracı (R3)

Deneyin yapılışı: Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 340 nm'de ultraviyole metotla 37 °C'de ölçüldü (Randox Lab., 2018). Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı.

Analiz için eritrosit paketinden 10 μ L alınarak 2 mL sulandırma ayıracı ile sulandırıldı (F = 201).

Tablo 2. GPx ayıraçların küvete pipetlenmesi

	Sulandırılmış Örnek	Ayıraç Körü
Örnek veya dH ₂ O	10 µL	10 µL
Ayıraç (R1)	500 µL	500 µL
Kümen (R2)	20 µL	20 µL

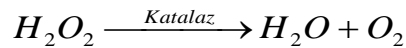
Küvetler karıştırılarak, örnek ve körün absorbansları 30 saniye sonra okundu. Okuma süresi 3 dakika olarak belirlendi ve dakika/absorbans değişimi hesaplandı.

Hesaplama: U/g protein doku = 8412 x 75 µL ΔA 340 nm/dakika. Örnek ve körün U/g protein tüm doku sonuçları için, örnek değerden (U/g), kör değeri (U/g) çıkarıldı. Sulandırma faktörü de hesaba katılarak sonuçlar tüm dokuda U/g protein doku olarak hesaplandı.

3.2.7.5.Katalaz (CAT) enzim tayini

Prensip: Enzim aktiviteleri doku süpernatantlarında ve eritrosit paketinde ölçüldü. Katalaz enziminin aktivite tayini, 37 °C 240 nm'de H₂O₂'in tüketilme esasına dayanan spektrofotometrik metoda göre tespit edildi (Aebi, 1974).

Katalaz, aşağıdaki reaksiyona göre H₂O₂'in suya ve oksijene ayrılmasını katalizler.



Katalaz tarafından H₂O₂'in dekompoze olma oranı, spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda ölçüldü. Çünkü H₂O₂, ışığı bu dalga boyunda absorbe etmektedir.

Kullanılan solüsyonlar aşağıda tablodaki gibi hazırlandılar.

Tablo 3. CAT fosfat tamponun hazırlanışı (pH:7.5)

Kimyasal	MA	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Sol. Adı
KH ₂ PO ₄	136,09 g/mol	6.805g	1000mL	A
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	358,14 g/mol	17.907 g	1000 mL	B ₁
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	178,14 g/mol	8.907 g	1000 mL	B ₂
Na ₂ HPO ₄ (saf)	141,96 g/mol	7.098 g	1000 mL	B ₃
CAT fosfat tampon solüsyonların karıştırılarak hazırlanması				
50 mM Fosfat tamponu (1 L)		A Solüsyonu (mL)	B Solüsyonu (mL)	
pH 7.5 için		160	840	

H₂O₂ çözeltisi ise; absorbanı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponudur. Yaklaşık 300 mL, pH 7,50 mM olan fosfat tamponu renkli kaba (plastik, cam olabilir) aktarılır. Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna göre sıfırlanıp renkli kaptaki tampona 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilave edilir. Optik Dansite (OD) 0.500 nm oluncaya kadar devam edilir ve aralarda karıştırılır.

Deneyin yapılışı: Numune ilavesi ile kuartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve hemen küvet alt-üst edilip absorban okunur. Absorbans azalması, her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir (Aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn'de bir kayıt yapılır lineer azalma tespit edilirse okuma bitirilebilir). Hesaplama 1 dakikalık lineer absorban azalmasının en yüksek (OD₁) ve en düşük (OD₂) değerleri esas alınır.

Tablo 4. CAT tampon ve örneklerin küvete pipetlenmesi

Tampon	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0.01	-
H ₂ O ₂ 'li fosfat tamponu	-	2.99
Süpernatant	-	0.01

Enzim aktivitesi hesabı: $A = e \times c \times L$,

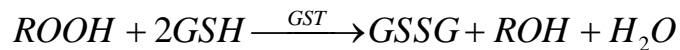
A: abs/dk, e: eks kat, c: konsantrasyon, L: ışık yolu (1 cm).

H₂O₂'nin 240 nm'deki milimolar Eks. Katsayısı: (0,0436 mM-1cm-1) 0,0436 mM= 0,0436 mmol/L= 0,0000436 mmol/mL= 0,0436 µmol/mL=43,6 nmol/mL.

Spesifik enzim aktivitesi (SA)= (Enzim Unitesi/mL)/(mg prt/mL) olarak ölçüldü.

3.2.7.6. Glutasyon S-transferaz (GST) enzim tayini

Preşip: Glutasyon S-transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun -SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm'de 37° C'de CDNB ile glutasyon konjugasyon şiddetini ölçerek tespit edilir (Mannervik ve Guthenberg, 1981).



Dokuda GST enzim tayini: Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı. 3 mL kuvartz küvette, 340 nm'de absorban ölçümü

gerçekleştirildi. Absorbanslar, 3 dakika boyunca 30 saniyede bir kaydedildi. Absorbans aralığındaki değişimin lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tespit edilerek ($EU = 3 (A/9.6)$) formülden sulandırma faktörünü de hesaba katılarak hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar dokular için nmol/mg protein doku olarak hesaplandı.

Tablo 5. Karışımların küvete alınması ile GST ölçümün yapılması

	Kör	Numune	Son konsantrasyon
PBS	2.7 mL	2.7 mL	0.1 M
Distile Su	0.1 mL	-	-
CDNB	0.1 mL	0.1 mL	1 mM
GSH	0.1 mL	0.1 mL	1 mM
Süpernatant	-	0.1 mL	-

3.2.8. *In vitro* analizler

3.2.8.1. Uçucu bileşiklerin analizi

Uçucu bileşik analizi Dogan ve ark. (2018)'e göre yürütüldü. Özetle, bitki materyali hekzan ile muamale edildikten sonra elde edilen non-polar fraksiyon Varian 2000 ion trap mass spectrometer arayüzlü ve alev iyonizasyon detektör (FID) donanımlı Varian 3800 gaz kromatografisinde, 260°C enjektör sıcaklığında gerçekleştirildi. Öğütülmüş bitki materyali 60 x 0.25 mm i.d., 0.2 µm HP 88 column (Agilent, USA) ile analiz edildi. Analiz işlemi sıcaklığın 80°C'ye ayarlanması ile başlatıldı, müteakiben sıcaklık 5°C/dakika oranla 190°C'ye yükseltilip, 190°C sıcaklıkta 3 dakika bekletildi. Daha sonra, 5°C/dakika oranıyla, sıcaklık 260°C'ye yükseltilerek ve bu sıcaklıkta 3 dakika inkübe edildi ve ardından 2°C/dakika oranıyla sıcaklık 275°C'ye yükseltilip, 12,5 dakika bekletildi. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Uçucu bileşikler total molekül ağırlıkları, parçalanma iyonları ve geliş zamanlarının NIST (National Institute of Standards and Technology) kütüphanesi ve Van den Dool ve Kratz (1963) tarafından tanımlanan kütle spektrum verileri ve güncel literatür verileri ile mukayase edilmesi sonucu tanımlandı.

3.2.8.2. HPLC analizi

Ekstrede bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanması ve konsantrasyonlarının belirlenmesi işlemleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Analitik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi +30 °C’de yürütüldü ve örnekler 250 nm, 280 nm, 326 nm, 370 nm ve 520 nm dalga boylarında kontrol edildi. HPLC analizlerinde kullanılan sistemler (Tablo 6) ve gradient programı (Tablo 7) aşağıda sunulduğu şekilde gerçekleştirildi. Çalışmada HPLC’ye özgü fenolik bileşik standartları kullanıldı. Analiz işlemi için HPLC’ye yüklenen tüm ekstralar ve standartlar enjektör yardımı ile 0.22 µm’lik hidrofilik filtreden geçirilerek filtre edildi.

Tablo 6. HPLC analizlerinde kullanılan olan sistemler

Sistem	Özellikleri
Detektör	DAD (SPD-M10ADVP)
Oto enjektör	SIL-10ADVP
Sistem kontrolcüsü	SCL-10A
Pompa	LC-10ADVP
Degaze	DGU-12A
Kolon fırını	CTO-1-ADVP
Kolon	Waters Atlantis DC ₁₈ , (4.6 mm×100 mm), 5 µm
Mobil faz	A: %0.5 TFA (Trifloroasetik asit) + %95 Ultra saf su. B: %0.5 TFA + %4.5 Ultra saf su + %95 Asetonitril.
Akış hızı	1 mL/da.
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Kolon sıcaklığı	30 °C

Tablo 7. HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı

Zaman (dakika)	A ¹ (%)	B ² (%)
2	100	0
5	80	20
10	60	40
15	40	60
20	20	80
25	0	100
30	0	100
32	100	0
40	100	0
40.01	0	0

¹ % 0.5 TFA (Trifloroasetik asit), ² % 0.5 TFA + % 4.5 Ultra saf su + % 95 Asetonitril

Fenolik bileşiklerin tanımlanması işlemi, ko-kromatografi, fenolik bileşik standartlarının spektral karakteristikleri ve geliş zamanları ile mukayese edilmesi sonucu gerçekleştirildi. Kantitatif analizler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Asit hidroliz işlemi için, ekstreden 10 mg tartılıp, cam tüpe konuldu ve 2 mL 2N Triflorik asit (TFA) ile muamele edildi. Tüp ısıtıcıya yerleştirilen ve 2 saat süreyle +120 °C'de bekletilen solüsyonlar 5 mL'lik volumetrik şişelere aktarıldı ve % 80'lik metanol ile hacim 10 mL'e tamamlandı ve filtre edilerek HPLC kullanılarak ilgili analiz işlemleri yürütüldü.

3.2.9. İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizinde Minitab 14 paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak, ikiden fazla olan gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey Çoklu karşılaştırma testinden yararlanıldı. Önem derecesi bütün testler için ($p \leq 0.05$) olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Otuz adet *Wistar albino* ırkı erkek sıçan her grupta 6 tane olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. I. Kontrol grubu: Normal yem + çeşme suyu, II. Etil alkol grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu, III. Etil alkol + Silymarin grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu + Silymarin (10 mg/kg/gün), IV. Etil alkol + *Platanus orientalis* (PO-20 mg/mL) grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu+ PO-20 mg/mL yaprak infüzyonu ve V. Etil alkol + *Platanus orientalis* (PO-60 mg/mL) grubu: Normal yem + % 20 etil alkol ilaveli çeşme suyu+ PO-60 mg/mL yaprak infüzyonu gruplarına deney süresi boyunca sıvı ve yem kısıtlamasına gidilmeden *ad libitum* beslenmeleri sağlandı. Otuz gün boyunca devam eden uygulamalar sonunda hayvanların haftalık canlı ağırlıkları ve sıvı tüketimlerine, karaciğer koruyucu etkilerinin göstergesi olarak değerlendirilebilecek karaciğer harabiyet biyobelirteçleri olan serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) ile glukoz (Glu), üre, ürik asit, kreatinin, total bilirubin, albumin, trigliserit, kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL_C) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL_C) gibi çeşitli biyokimyasal parametre düzeylerine bakıldı. Ayrıca karaciğer, beyin ve eritrosit dokusu örneklerinde antioksidan kapasite etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirilebilecek antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ile Malondialdehit (MDA) düzeyleri tespit edildi.

Elde edilen sonuçlara göre; Tablo 8’de belirtildiği üzere, kontrol grubunda 3.haftadaki canlı hayvan ağırlıkları 2. hafta ve 4. haftaya göre istatistiksel açıdan önemli düşüş ($p \leq 0.05$) gösterdi. Etil alkol+PO-20 mg/mL grubunda 2. hafta ve 4. haftadaki canlı hayvan ağırlıkları 1.haftaya göre istatistiksel açıdan önemli düşüş ($p \leq 0.05$) gösterirken Etil alkol+PO-60 mg/mL grubunda ise 2. hafta canlı hayvan ağırlıkları diğer haftalara göre istatistiksel açıdan önemli artış ($p \leq 0.05$) gösterdi. Benzer şekilde Etil alkol+PO-60 mg/mL grubunda 4.hafta 1.haftaya göre önemli düşüş gösterdi.

Hayvanların haftalık sıvı tüketimleri Tablo 8’de gösterildiği gibi Kontrol grubunda 3. haftadaki sıvı tüketimi 1. haftaya göre düşüş Etil alkol grubundaki 3 ve 4. haftalardaki sıvı tüketimi ise 1. hafta ve 2. haftalara göre önemli artış gösterdi. Etil

alkol+ PO-20 ve 60 mg/mL gruplarında 1.hafta diğer haftalara göre istatistiksel açıdan önemli düşüş gösterdi.

Tablo 8. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve *P.orientalis*'in canlı hayvan ağırlıkları ve sıvı tüketimine etkisi

	Hafta	Kontrol	Etil alkol	Etil alkol+Silymarin	Etil alkol+PO- 20 mg/mL	Etil alkol+PO-60 mg/mL
Canlı Ağırlık (g)	1.Hafta	267.00±16.24	243.00±25.13	228.67±28.97	254.67±31.21	216.33±10.91
	2. Hafta	263.33±12.11	228.59±24.25	215.65±25.18	217.00±27.85*	254.67±35.32*
	3.Hafta	281.00±12.70 [#]	233.67±18.52	233.00±28.78	229.33±30.16	209.67±18.65 [#]
	4.Hafta	263.34±12.11 ^ψ	228.66±24.23	215.64±25.18	208.67±20.30*	188.00±20.51 ^{*#}
Sıvı Tüketimi (mL)	1.Hafta	302.86±66.26	106.43±8.52	112.86±11.13	180.00±46.55	167.14±55.89
	2. Hafta	262.86±57.65	130.00±42.82	130.23±23.80	135.43±19.65*	117.14±12.54*
	3.Hafta	238.57±35.79*	145.71±52.55 ^{*#}	178.57±50.47	125.43±21.13*	111.43±9.00*
	4.Hafta	248.57±43.75	141.43±54.29 ^{*#}	180.01±52.63	127.57±21.63*	118.57±10.11*

* :1.Hafta ile diğer haftalar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

#: 2.Hafta ile diğer haftalar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

ψ:: 3.Hafta ile 4.Hafta arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

Tablo 9’da görüldüğü gibi, Etil alkol grubunda AST değeri Kontrol ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarına göre önemli artış gösterdi.

Tablo 9. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve *P.orientalis*’in biyokimyasal parametrelere etkisi

Parametre	Kontrol	Etil alkol	Etil alkol+Silymarin	Etil alkol+PO-20 mg/mL	Etil alkol+PO-60 mg/mL
AST (U/L)	98.33±10.82	119.20±16.08 ^a	102.40±16.38	103.67±10.29	96.83±14.19 ^b
ALT (U/L)	33.50±3.56	45.00±9.75 ^a	40.00±5.43 ^a	41.17±4.83 ^a	44.67±4.55 ^a
LDH (U/L)	740.50±130.79	962.80±144.59 ^a	732.80±166.71 ^b	862.67±239.92	728.33±108.23 ^b
ALP (U/L)	165.50±37.36	201.00±19.33	179.60±38.04	172.00±22.11 ^b	177.83±27.14
GGT (U/L)	2.10±0.37	10.27±1.70 ^a	7.75±1.36 ^{ab}	11.42±1.87 ^{ac}	6.33±1.32 ^{abd}
Kreatinin (mg/dL)	0.54±0.04	0.55±0.04	0.55±0.04	0.51±0.03	0.55±0.06
Ürik asit (mg/dL)	1.88±0.42	3.40±0.85 ^a	2.22±1.58	1.70±0.55 ^b	1.92±0.46 ^b
Üre (mg/dL)	41.50±4.04	51.00±4.30 ^a	48.80±8.17	47.83±4.88 ^a	52.00±7.13 ^a
T.bilirubin (mg/dL)	0.12±0.02	0.10±0.02	0.14±0.02 ^b	0.12±0.02	0.12±0.01
Albumin (g/L)	28.17±3.31	29.80±1.10	30.20±2.17	30.50±1.22	30.33±1.21
Glukoz (mg/dL)	154.33±40.40	152.80±29.06	143.60±19.78	163.17±28.07	153.17±23.98
Trigliserit (mg/dL)	70.33±17.68	82.80±15.87	83.00±16.39	107.17±20.76 ^a	86.83±23.47
Kolesterol (mg/dL)	62.17±9.56	45.20±3.11 ^a	44.40±6.54 ^a	53.00±6.32	51.33±9.03
HDL_C (mg/dL)	47.32±5.97	29.90±2.19 ^a	29.80±3.18 ^a	34.73±3.02 ^{abc}	34.77±5.80 ^a
LDL_C (mg/dL)	12.15±1.34	13.98±2.00	9.96±1.82 ^{ab}	11.57±1.88	10.97±2.21 ^b

a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

b: Etil alkol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

c: Etil alkol+Silymarin grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

d: Etil alkol+PO-20 mg/mL ile Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

Kontrol grubu ALT değeri diğer tüm gruplara göre önemli düşüş tespit edildi.

Etil alkol grubu LDH değeri Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu dışındaki gruplara göre önemli artış gösterdi.

Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu ALP düzeyi Etil alkol grubuna göre önemli düşüş gösterdi.

Etil alkol grubu GGT değeri Kontrol grubunda tüm gruplara göre önemli düşüş gösterirken Etil alkol grubu GGT değeri ise Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu dışındaki gruplara göre önemli artış gösterdi. Ayrıca, Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu GGT değeri Etil alkol+Silymarin ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarına göre istatistiksel açıdan önemli artış tespit edildi.

Ürik asit Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu dışında diğer gruplara göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi.

Üre Kontrol grubunda Etil alkol+Silymarin grubu dışında diğer gruplara göre istatistiksel açıdan önemli azalma gösterdi.

Total bilirubin düzeyi Etil alkol+Silymarin grubunda Etil alkol'e göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi.

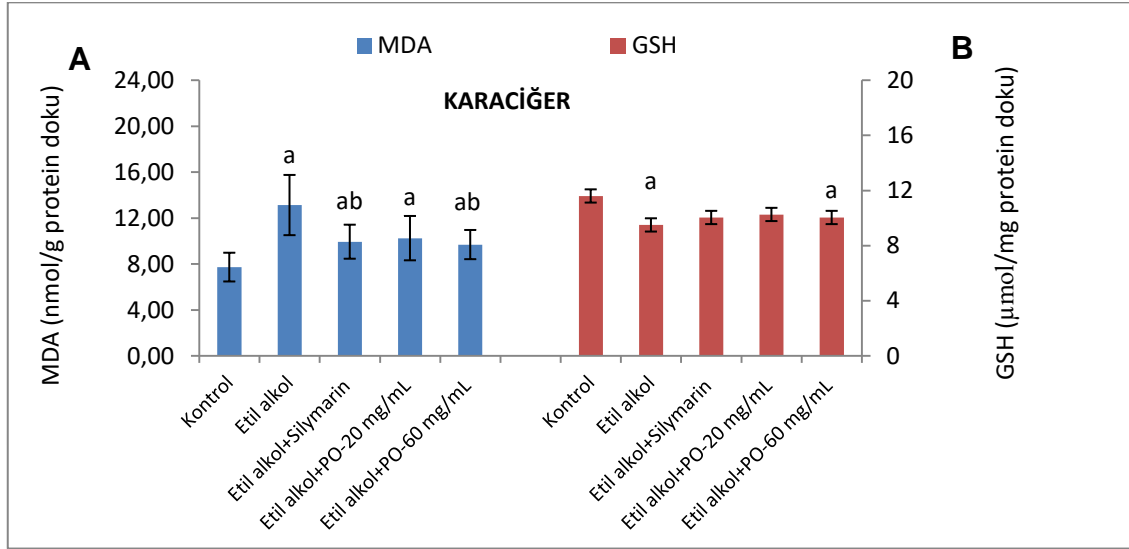
Trigliserit düzeyi Etil alkol+PO-20 mg/mL grubunda Kontrol'e göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi.

Kolesterol düzeyi Etil alkol ve Etil alkol+Silymarin gruplarında Kontrol'e göre istatistiksel açıdan önemli azalma tespit edildi.

HDL_C değeri Kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre artış, Etil alkol+PO-20 mg/mL grubunda ise Etil alkol ve Etil alkol+Silymarin gruplarına göre artış istatistiksel açıdan önemli bulundu.

LDL_C değeri Kontrol grubunda Etil alkol+Silymarin grubuna göre artış, Etil alkol grubunda ise Etil alkol+Silymarin ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarına göre artışı istatistiksel açıdan önemli bulundu.

Diğer parametreler ise belirlenen grup kıyaslanmasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı.

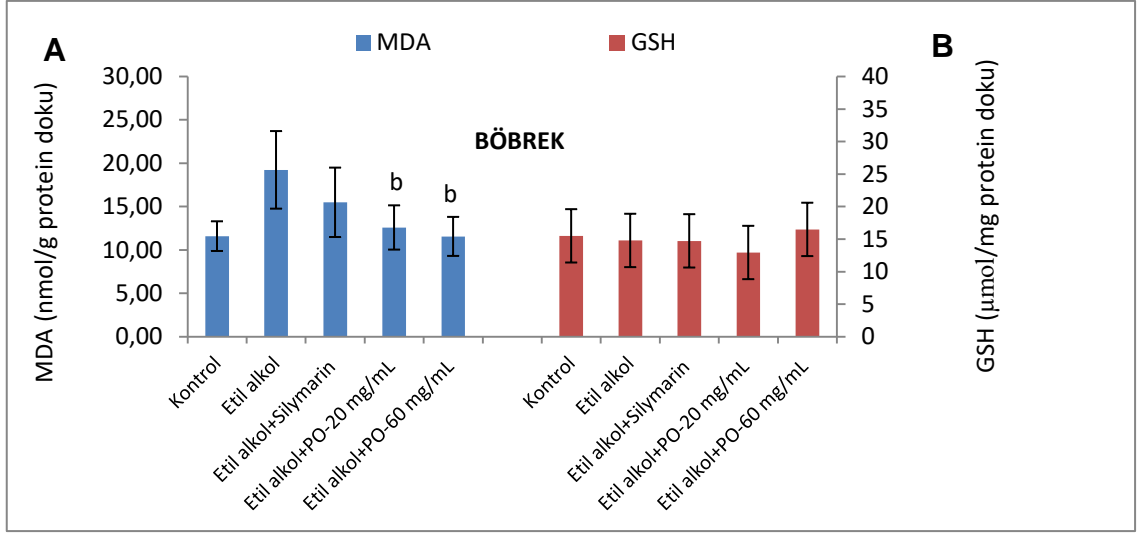


- a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- b: Etil alkol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- c: Etil alkol+Silymarin grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- d: Etil alkol+PO-20 mg/mL ile Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).

Şekil 3. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Silymarin ve *P.orientalis*'in karaciğer dokusu MDA ve GSH seviyeleri

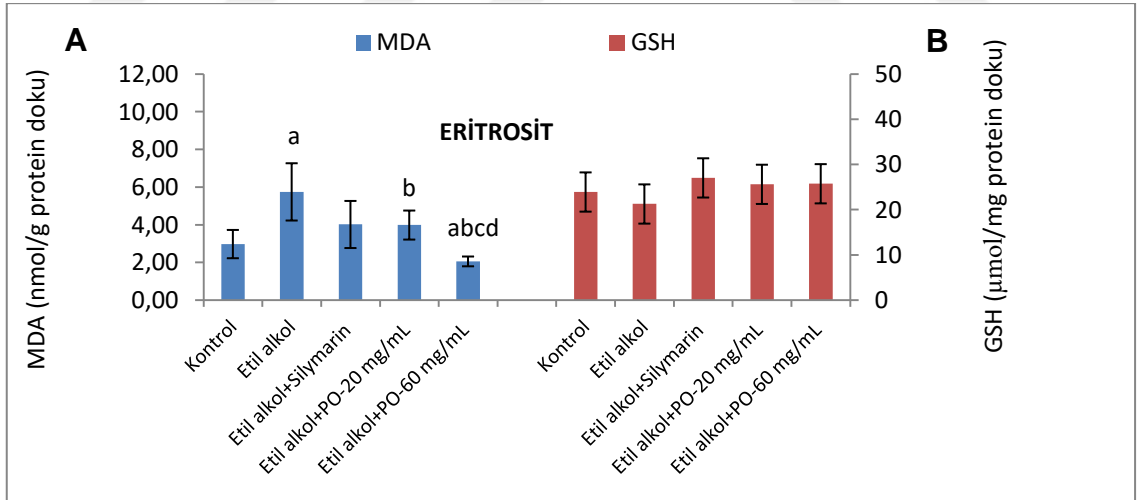
Şekil 3'teki sonuçlara göre; karaciğer dokusu MDA içeriği Kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak önemli düşüş gösterirken Etil alkol+Silymarin ve Etil alkol+PO-60 mg/mL grupları ise Etil alkol grubuna göre önemli düşüş gösterdi. Ayrıca, GSH seviyesi Etil alkol ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli düşüş gösterdi. Belirlenen diğer grupların kıyaslanmasında ise istatistiksel açıdan fark önemli bulunmadı.

Şekil 4'teki sonuçlara göre; böbrek dokusu MDA içeriği Etil alkol+PO-20 mg/mL ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarında Etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli düşüş gösterdi. Böbrek dokusu GSH seviyesinde ise belirlenen grupların kıyaslanmasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı.



- a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- b: Etil alkol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- c: Etil alkol+Silymarin grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- d: Etil alkol+PO-20 mg/mL ile Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).

Şekil 4. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Silymarin ve *P.orientalis*'in böbrek dokusu MDA ve GSH seviyeleri



- a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- b: Etil alkol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- c: Etil alkol+Silymarin grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).
- d: Etil alkol+PO-20 mg/mL ile Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu arasındaki fark önemlidir ($P \leq 0.05$).

Şekil 5. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Silymarin ve *P.orientalis*'in eritrosit dokusu MDA ve GSH seviyeleri

Şekil 5'teki sonuçlara göre; eritrosit dokusu MDA içeriği Etil alkol grubunda Kontrol ve Etil alkol+PO-20 mg/mL grubuna göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterirken, Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu MDA içeriği ise tüm gruplara göre istatistiksel olarak önemli düşüş gösterdi. Eritrosit dokusu GSH seviyesinde ise belirlenen grupların kıyaslanmasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı.

Tablo 10'da belirtildiği gibi, karaciğer dokusunda bakılan SOD, GPx, CAT ve GST enzimlerinden sadece Etil alkol grubunda GST aktivitesi Kontrol'e göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi. Diğer antioksidan enzim aktivitelerinde ise Etil alkol grubunda genel olarak düşüşler görülse de istatistiksel açıdan fark önemli bulunmadı.

Böbrek dokusunda Kontrol SOD aktivitesi diğer grupların tümüne göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi.

Böbrek dokusunda Kontrol GPx aktivitesi Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu dışında diğer grupların tümüne göre artış, Etil alkol grubunda diğer gruplara göre düşüş ve Etil alkol+PO-20 mg/mL ve Etil alkol+PO-60 mg/mL gruplarda Etil alkol+Silymarin grubuna göre artış istatistiksel açıdan önemli bulundu.

Böbrek dokusunda Kontrol grubu CAT aktivitesi Etil alkol+PO-20 mg/mL grubu dışında diğer gruplara göre artış, Etil alkol+PO-20 mg/mL grubunda ise Etil alkol+PO-60 mg/mL grubuna göre azalma istatistiksel açıdan önemli bulundu.

Eritrosit dokusunda CAT aktivitesi Etil alkol+Silymarin grubunda Etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli artış gösterdi.

Eritrosit dokusunda GST aktivitesi Kontrol grubunda diğer tüm gruplara istatistiksel açıdan önemli azalma gösterdi.

Tablo 10. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda silymarin ve *P.orientalis*'in çeşitli dokulardaki antioksidan enzimlere etkisi

Doku	Enzim parametresi	Kontrol	Etil alkol	Etil alkol+Silymarin	Etil alkol+PO- 20 mg/mL	Etil alkol+PO-60 mg/mL
KARACİĞER	SOD U/g Protein	54.58±7.07	46.58±7.99	49.39±11.18	51.34±12.22	48.82±7.40
	GPx U/g Protein	8.11±1.76	7.49±0.94	7.20±1.75	6.67±0.91	7.27±1.85
	CAT nmol/g Protein	18.89±1.70	16.90±2.77	17.55±1.92	17.15±3.25	16.93±1.11
	GST nmol/g Protein	47.46±3.29	56.74±6.28 ^a	46.75±8.59	52.04±12.33	53.51±7.28
BÖBREK	SOD U/g Protein	128.06±18.99	72.95±21.12	74.85±13.41 ^a	65.33±10.66 ^a	83.04±15.17 ^a
	GPx U/g Protein	12.43±2.28	4.45±1.09 ^a	8.24±2.05 ^{ab}	14.85±3.13 ^{bc}	17.24±0.52 ^{abc}
	CAT nmol/g Protein	29.45±7.68	17.37±2.91 ^a	18.08±3.77 ^a	13.92±2.48	20.65±3.41 ^{ad}
	GST nmol/g Protein	18.32±5.89	22.26±5.03	16.80±4.57	18.07±4.41	20.80±3.99
ERİTROSİT	SOD U/g Protein	57.57±12.34	47.84±11.30	48.78±8.93	58.26±12.06	53.84±12.74
	GPx U/g Protein	23.39±5.66	19.31±2.31	19.07±3.86	20.58±4.23	19.96±2.42
	CAT nmol/g Protein	10.38±1.60	9.04±1.75	11.13±0.93 ^b	10.92±1.65	10.79±0.89
	GST nmol/g Protein	1.49±0.29	2.87±0.62 ^a	3.03±0.69 ^a	2.57±0.47 ^a	2.56±0.71 ^a

a: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

b: Etil alkol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

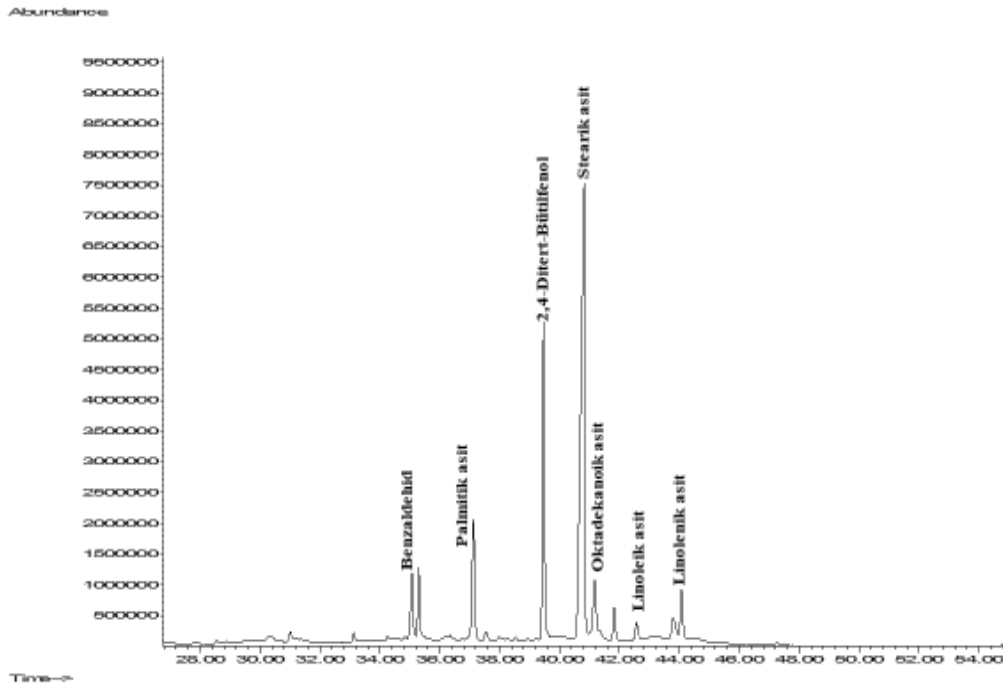
c: Etil alkol + Silymarin grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

d: Etil alkol + PO-20 mg/mL ile Etanol+PO-60 mg/mL grubu arasındaki fark önemlidir (P≤0.05).

Tablo 11. ve Şekil 6’da görüldüğü gibi *P.orientalis* bitki materyal ierğindeki GC-MS sonuçlarının geliş zamanı, bileşik adı ve % konsantrasyonları sırasıyla; 35.07 (Benzaldehit) % 4.15, 37.12 (Palmitik asit) % 8.12, 39.46 (2,4-Ditert-Butylphenol) % 15.58, 40.82 (Stearik asit) % 44.23, 41.17 (Oktadekanoik asit) % 5.91, 42.57 (Linoleik asit) % 1.10 ve 44.06 (Linolenik asit) % 2.99 olduğu belirlendi

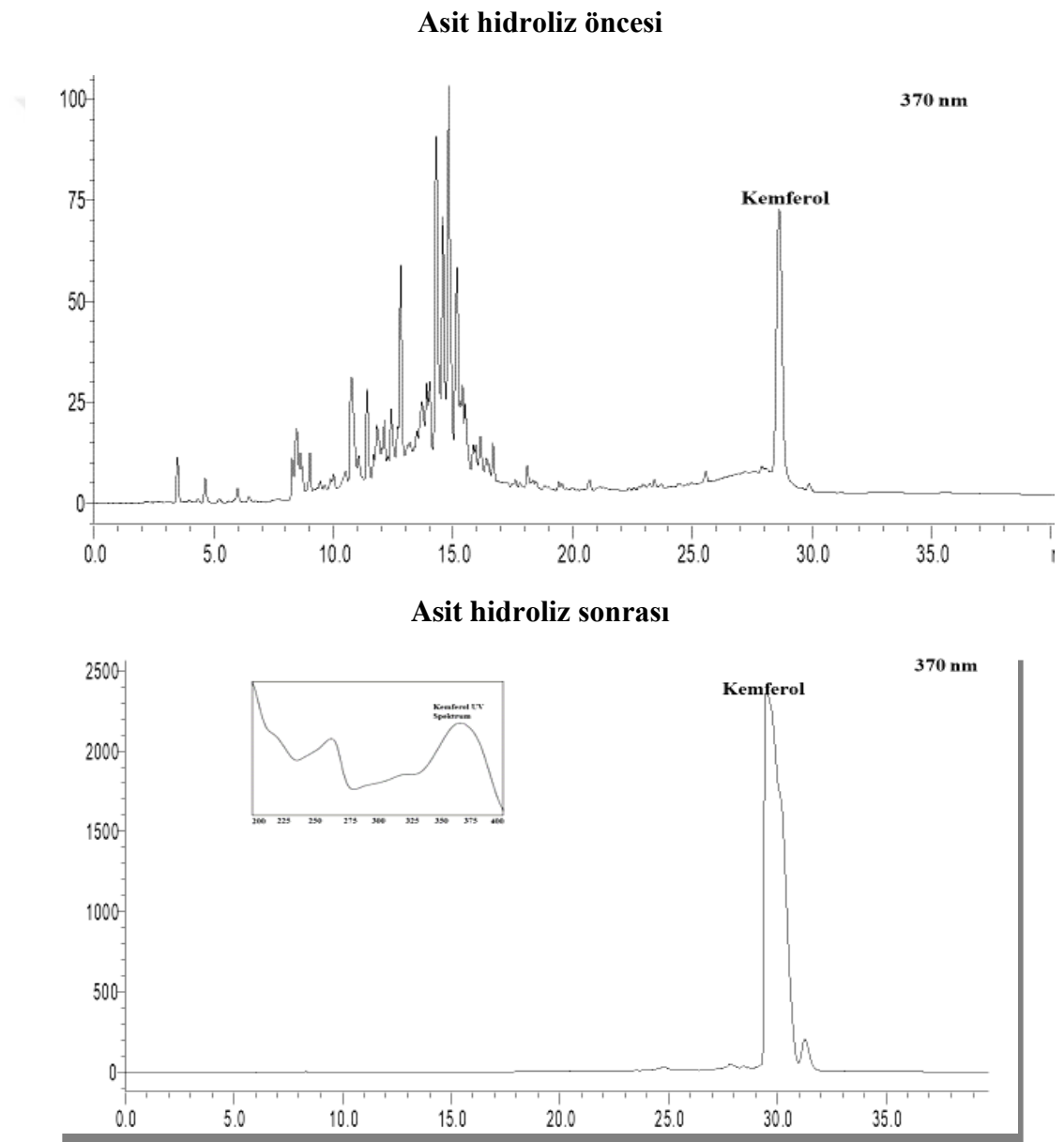
Tablo 11. *P.orientalis* bitki yaprağı GC-MS sonuçları

	Geliş Zamanı	Bileşik	Relatif Konsantrasyon (%)
1.	35.07	Benzaldehit	4.15
2.	37.12	Palmitik asit	8.12
3.	39.46	2,4-Ditert-Butylphenol	15.58
4.	40.82	Stearik asit	44.23
5.	41.17	Oktadekanoik asit	5.91
6.	42.57	Linoleik asit	1.10
7.	44.06	Linolenik asit	2.99



Şekil 6. *P.orientalis* bitki yaprağı GC-MS sonuçları

Şekil 7’de görüldüğü kromatografik ve spektral analizler neticesinde *P.orientalis* ekstrede bulunan major bileşik kaempferol olarak belirlenmiştir. Asit hidroliz işlemi uygulaması neticesinde kromatogramda bulunan bileşiklere ait pikler kaybolmuş ve ekstrede bulunan kaempferol bileşiğinin miktarını kayda değer bir şekilde arttırmıştır. Kaempferol bileşiği standardı aynı zamanda HPLC’de yürütülmüş olup, ekstredeki kaempferol ile spektral karakteristik, ko-kromatografi ve geliş zamanları ile mukayese edilmiş olup, ekstredeki baskın bileşiğin kaempferol ve kaempferol türevleri oldukları belirlenmiştir.



Şekil 7. *P.orientalis* yaprağı ekstresinin HPLC profili

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çınar (*Platanus*) cinsi, ikisi ülkemizde olmak üzere dünya üzerinde şimdiye kadar 9 türü tanımlanmıştır. Bu bitkinin bazı tıbbi özellikleri nedeniyle insanlar yapraklarını, kabuklarını ve tohumlarını yılan ısırıkları, ses kısıklığı, astım, eklem ağrısı ve kireçlemeye karşı kullanmaktadır. Ancak bu bitkinin başta böbrek ve karaciğer organları olmak üzere olumlu veya olumsuz etkilerinin olup olmadığı, bu etkilere sebep olan fitokimyasal içeriğinin neler olduğu ve belki de en önemlisi bu bitkinin hangi dozlarda tüketilmesi gerektiği ile ilgili literatüre rastlanılmamıştır. İlk defa bu çalışmada etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Çınar (*Platanus orientalis* L.) bitki yaprağı infüzyonunun doku koruyucu rolü ve fitokimyasal içeriği araştırılmıştır.

Bu çalışmada, 30 gün boyunca *P.orientalis* yaprak infüzyonunun iki farklı dozu (20 ve 60 mg/mL) ile beslenen sıçanların haftalık canlı ağırlıkları ve sıvı tüketimlerinin yanı sıra etil alkol hasarına karşı iyileştirici etkilerinin göstergesi olarak değerlendirilebilecek serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), alkalin fosfat (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) ile glukoz (Glu), üre, ürik asit, kreatinin, total bilirubin, albumin, trigliserit, kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL_C) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL_C) gibi çeşitli biyokimyasal parametre düzeylerine bakıldı. Ayrıca karaciğer, böbrek ve eritrosit dokusu süpernatant örneklerinde antioksidan kapasite etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirilebilecek antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ile Malondialdehit (MDA) düzeylerine bakıldı. Bu *in vivo* parametrelere ek olarak *in vitro* olarak *P.orientalis* bitki yaprağı GC-MS ve HPLC sonuçları değerlendirildi.

Tablo 8’de görüldüğü gibi canlı hayvan ağırlıkları son haftalarda Kontrol grubunda artış görülürken Etil alkol+PO gruplarında ise genel olarak düşüş gözlemlendi. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda canlı hayvan ağırlıkları Etil alkol grubunda 4 haftada 1 haftaya göre önemli düşüş gösterirken Ginger+Etil alkol grubunda ise önemli artış olduğu rapor edilmiştir (Akbari ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada % 20’lik etil alkol ile 60 gün boyunca beslenen ratların başlangıç ve son canlı hayvan ağırlıklarında istatistiksel açıdan bir farkın olmadığı rapor edilmiştir (Bati ve ark., 2015). Çalışmamızdaki canlı hayvan ağırlıkları literatür sonuçlarıyla uyumlu olduğu saptanmıştır. Ayrıca Etil alkol+PO gruplarındaki canlı

hayvan ağırlıklarındaki düşüş Tablo 8’de görüldüğü gibi sıvı tüketimi ile canlı hayvan ağırlıkları arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir.

Tablo 9’da görüldüğü gibi serum biyokimyasal parametrelerinden AST, ALT, LDH, ürik asit, üre ve GGT parametreleri Etil alkol grubunda, Kontrol grubuna göre önemli artış gösterirken tedavi gruplarındaki düzeyleri ise genel olarak Kontrol değerlerine çekildiği görülmektedir. GGT parametresinde ayrıca doza bağlı bir düşüşün olduğu görülmektedir. Lipit profili parametrelerinden Kolesterol Etil alkol ve Etil alkol+Silymarin gruplarında Kontrol grubuna göre önemli artış gösterirken HDL_C düzeyi ise Kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre önemli artış, Etil alkol+PO-20 mg/mL grubunda ise Etil alkol grubuna göre önemli azalma gösterdi. LDL_C düzeyi Etil alkol+Silymarin grubunda Kontrol ve Etil alkol gruplarına göre önemli düşüş gösterirken benzer şekilde Etil alkol+PO-60 mg/mL grubu da Etil alkol grubuna göre önemli düşüş gösterdi. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda Etil alkol grubu AST, ALT, ALP değerleri Kontrol ve Etil alkol+Silymarin 50 mg/kg grubuna göre artış gösterdiği rapor edilmiştir (Das ve ark., 2018). İki hafta boyunca % 20’lik etil alkol ile beslenen sıçanların serum AST, ALT, kreatinin, üre ve trigliserit düzeyleri kontrol ve tedavi gruplarına (etanol+klonidin) göre önemli artış gösterdiği belirtilmiştir (Elkomy et al., 2018). Yirmi dört hafta süren bir çalışmada ilk dört hafta 5 g/kg günde tek doz, 5 ve 8.haftalarda 7 g/kg günde tek doz, 9 ve 12. Haftalarda 9 g/kg, 13 ve 24.haftalarda ise 9.5 g/kg etil alkol ile beslenen sıçanların serum AST, ALT, MDA, TNF- α ve IL-1b düzeyleri etanol grubunda artış etanol+Silymarin (100 mg/kg) ve etanol+fraksetin (20 ve 50 mg/kg) gruplarında ise önemli düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2018). Kadmiyum (Cd) ve etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanların Cd+Etanol grubu tedavi gruplarına göre serum kolesterol, SOD, GPx, GST, CAT ve GSH düzeylerinde düşüş bilirubin, ürik asit, GGT, LDH, ALP, AST, ALT ve MDA düzeylerinde önemli artış olduğu rapor edilmiştir (Abarikwu ve ark., 2017). Sonuçlarımız genel olarak literatürlere paralellik arz ettiği ancak bazı parametrelerimizde gruplar arasında farklılık bulunmadığı görülmektedir. Bu farklılık kullanılan doz ve deney süresi ile tedavi gruplarında kullanılan dozun düşüklüğü sonucu olabilir. Ayrıca Çınar ile ilgili daha önce böyle bir çalışma yapılmadığından buna dair çalışmalarla kıyaslama yapılmamıştır.

Şekil 3, 4 ve 5 ile Tablo 10’da görüldüğü gibi bir ay boyunca sadece % 20’lik etil alkol ile beslenen grubun karaciğer dokusu MDA ve GST içeriğinde artış GSH düzeyinde ise azalma tedavi gruplarında ise bu değişimin Kontrol değerlerine çekildiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Etil alkol grubu böbrek dokusu MDA içeriği Etil alkol+PO (20 ve 60 mg/mL)

gruplarına göre önemli artış gösterdi. Diğer yandan antioksidan savunma enzimlerinden SOD, GPx ve CAT (GPx ve CAT için Etil alkol+ PO-20 mg/mL grubu hariç) Kontrol grubu diğer tüm gruplara göre önemli düşüş gösterirken Etil alkol grubunda GPx hem pozitif (Etil alkol+Silymarin) hem de tedavi (Etil alkol+PO 20 ve 60 mg/mL) gruplarına göre önemli düşüş gösterdi. Ayrıca GPx tedavi grupları pozitif grubuna göre CAT ise Etil alkol+PO-60 mg/mL grubunda Etil alkol+PO-20 mg/mL grubuna göre önemli artış gösterdi. Eritrosit dokusu MDA içeriği Etil alkol grubunda Kontrol ve Etil alkol+PO (20 ve 60 mg/mL) gruplarına göre önemli artış gösterdi. Eritrosit dokusunda antioksidan savunma sistem enzimlerinden CAT Etil alkol+Silymarin grubunda Etil alkol grubuna göre önemli artış gösterirken GST aktivitesi Kontrol grubunda diğer tüm gruplara göre önemli düşüş gösterdi. Elli gün boyunca normal yemin yanında % 20'lik etil alkol beslenen sıçanların deney sonundaki Etil alkol grubundaki karaciğer, böbrek ve eritrosit dokularında MDA düzeylerinde artış görülürken SOD, GPx, GST ve GSH enzim düzeylerinde ise dokudan dokuya bazı dalgalanmalar olmakla beraber genel manada düşüşler olduğu rapor edilmiştir (Yurt ve Celik, 2011; Dogan ve Celik, 2012; Bati ve ark., 2015). Yapılan pek çok çalışmada etil alkol tüketiminin karaciğer ve böbrek harabiyet biyobelirteç parametreleri ve lipid peroksidasyonunda önemli artışlar gözlenirken antioksidan savunma sisteminde görevli enzim aktivitelerinde düşmeler gözlemlendiği ancak; koruyucu amaçlı kullanılan gıda, ilaç veya ekstre içeriğinin verildiği gruplarda doku hasarı biyobelirteç parametrelerinde ve MDA içeriğinde düşüş, antioksidan enzim aktivitelerinde ise genel manada artış olduğu rapor edilmiştir (Ozkol ve ark., 2017; Abarikwu ve ark., 2017; Elkomy et al., 2018; Chen ve ark., 2018). Sonuçlarımız daha önce yapılmış çalışmalarla genel manada uyumlu olduğu ve Çınar yaprağı infüzyonunun etil alkol kaynaklı oksidatif stresi azalttığına göstergesi olan MDA ve doku harabiyet parametrelerindeki düşüş ile antioksidan enzim düzeylerindeki artışlar bitkinin antioksidan etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Tablo 11, Şekil 6 ve 7'de görüldüğü gibi GC-MS sonuçları sonucu benzaldehit, palmitik asit, 2,4-Ditert-Butylphenol, stearik asit, oktadekanoik asit, linoleik asit ve linolenik asitler belirlenirken HPLC profilinde ise hem asit hidroliz öncesi hemde asit hidroliz sonrasında yapılan analiz sonucunda ekstrede bulunan major bileşiğin kaempferol ve türevleri olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda *P.orientalis* bitkisinin kaempferol türevlerini (Khan, 2017), betulinik ve betulonik asitler içerdiği rapor edilmiştir (Bastos ve ark., 2007). *P.orientalis* kökünden hekzan ile hazırlanan ekstrenin palmitik, stearik, oleik, linoleik ve linolenik yağ asitleri ile 3,4-hidrobenzoik asit ve kateşin fenollerini içerdiği rapor

edilmiştir (Dönmez ve ark., 2016). Yüksek demir takviyesiyle karaciğer steatozu oluşturulan sıçanlarda sızma zeytinyağında bulunan hidro-ksilolrol, oleik asit, tokoferol ve çoklu doymamış yağ asitlerinin koruyucu etkisinin olabileceği rapor edilmiştir (Berrera ve ark., 2018). Kaempferol ve türevlerinin *in vitro* ve *in vivo* denemelerde mide kanserini engellemede (Song ve ark., 2015), böbrek kanserinde ve hücre ölümü süreçlerinde olumlu tetiklemelere neden olduğu bildirilmiştir (Song ve ark., 2014).

Daha önce yapılmış pek çok çalışmada etil alkolün serbest radikal üretimi nedeniyle başta karaciğer ve böbrek organları olmak üzere zarar verdiği ve bu zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması veya minimize edilmesinde gıda, ilaç, ekstre, vitamin vb. takviyelerin önemli rol aldığı gösterilmiştir. Çınar bitkisi ile ilgili deneysel çalışmaların sınırlı olması ve yaptığımız bu çalışmaya benzer bu bitki ile ilgili daha önce çalışmalara rastlanılmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak bitkinin fitokimyasal içeriği ile ilgili daha önce yapılan bazı çalışmalarda bitkinin kumaryl rhamnopyranosid, platanoside, kaempferol, kumaroylglukopyranosid, tiliroside, kaempferol-3-rhamnopyranoside (afzelin), quersetin, nikotiflorin, rutin ve kumarik asit gibi birçok fitokimyasal metabolitin varlığı ortaya konulmuştur (Mitrokosta ve ark. 1993; Dimas ve ark. 2000; Natakani ve arkadaşları 2000; Khan, 2017). Çınar ağacı kabuğundan hazırlanan ekstraktın betulinik asit ve betulonik asit içeriğine sahip olduğu ve bu bileşiklerin anti-HIV ve antikanser aktivitelerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Bastos ve ark. 2007). Çınar ağacı yapraklarından hazırlanan etanolik ekstrakt fraksiyonlarının anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Haider ve ark., 2012). Çınar yaprağı etanolik ekstraktından elde edilen bazı flavonol glikoziti bileşiklerin NF-κB, NO, aromataz ve QR2 ile kanserin önlenmesinde etkili olabileceği rapor edilmiştir (Tantry ve ark. (2012). *Platanus orientalis* L. tomurcuklarından hazırlanan metanolik ekstraktında izole edilen kaempferol glikozidlerinden platanoside ve tiliroside'in insan lösemik hücre dizilerinde *in vitro* sitotoksik aktivitelerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Dimas ve ark., 2000). Kuzey Pakistan'da *Platanus orientalis* L.'nin yılan ve akrep ısırığına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Butt ve ark., 2015). Çınar ağacı kabuklarının kaynatılmış suyu ses kısıklığı ve astımda (Asadbeigi ve ark., 2014), Çınar yapraklarının ise öksürük ve göğüsteki sıkışmalara karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Mirsadraee ve ark., 2018). Çınar yaprağında bulunan flavonoidler, proantosiyanidin glikozitler, penta-aromatik triterpenoidler, tannin, fitol türevleri ve kafeik asit gibi aktif bileşiklerin geleneksel tedavide osteoartrit, gut ve antidepresan gibi olumlu etkileri olduğu bildirmiştir (Saraçoğlu, 2018). Pakistan'da *Platanus orientalis* bitki kabuğunun diyare ve diş ağrısında kullanıldığını bildirmiştir (Lizzio,

2014). ınar bitkisinde kaepferol glikozidlerinden tiliroside maddesinin normal insan fibroblastlarında proteazomu aktifleştirerek hücresele yaşlanmanın ilerlemesini geciktirdiği bu nedenle *P. orientalis* meyvelerinden elde edilen doğal ürünlerin potansiyel yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip olabileceği tavsiye edilmiştir (Chatzigeorgiou ve ark., 2017). ınar bitkisinin tıbbi özellikleri dışında özellikle karbon emisyonu, hava kirliliği, ağır metal temizleyicisi ve gümüş nanopartikül üretimi gibi önemli rolleri olduğu belirtilmiştir (Stoop ve ark., 1996; Hoshika ve ark., 2014; Barış Özel ve ark., 2015; Khosropour ve ark., 2017; Janković ve ark. 2018; Majeed ve ark., 2018).

Sonuç olarak; bulgularımıza bir bütün olarak bakıldığında ınar yaprağı infüzyonunun karaciğer ve böbrek harabiyet parametrelerini ve lipid peroksidasyonunu önemli derecede düşürdüğu, antioksidan savunma enzim aktivitelerini artırdığı, lipid profili parametrelerinde az da olsa olumlu etkiler gösterdiği ve kilo artışında düşmelere neden olduğundan dolayı obezite tedavisinde bir diyet stratejisi olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu etkilerin sebebi kesin olmamakla beraber ınar yaprağının içermiş olduğu başta kaempferol ve türevleri, esansiyel yağ asitleri ve benzaldehit gibi maddelerin olumlu etkileri sonucu olabilir.

Yapılan bu *in vivo* alışmayla ileride yapılacak hayvan deney modellerinde, moleküler düzeydeki gen ekspresyonu ve hücre kültürü çalışmalarında önemli katkı sunacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

Abarikwu SO, Njoku RC, Lawrence CJ, Charles IA, Ikewuchi JC. Rutin ameliorates oxidative stress and preserves hepatic and renal functions following exposure to cadmium and ethanol, *Pharmaceutical Biology*. 2017; 55 (1): 2161-69.

Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res*. 2010; 24: 1423-32.

Aebi H. Catalase. Bergemeyer HU. Ed. In *Methods of Enzymatic Analysis* New York-London; Academic Press; 1974.

Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Mosavat SH, Iraj A. The protective effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger) on ethanol-induced reproductive toxicity in male rats. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*. 2017; 22(4): 609-17.

Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, ve ark. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. (in press) 2018. doi: 10.1055/s-0044-101355.

Ali SJ, Shapour H, Hassan M. Beneficial effects of *Achillea millefolium* aqueous extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2013; 3(2); 113-9.

Asadbeigi M, Mohammadi T, Rafieian-Kopaei M, Saki K, Bahmani M, Delfan M. Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: an ethnobotanical study in the Urmia. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2014; 7: 364-8.

Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: A meta-analysis. *Alcohol Research & Health*. 2001; 25(4): 263–70.

Bai J, Yu N, Mu H, Dong L, Zhang X. Histidine protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress injury through the NF-κB pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2018; 119(2): 1637-45.

Barış Özel H, Uçun Özel H, Varol T. Using Leaves of Oriental Plane (*Platanus orientalis* L.) to Determine the Effects of Heavy Metal Pollution Caused by Vehicles. Polish Journal of Environmental Studies. 2015; 24(6): 2569-75.

Barrera C, Valenzuela R, Rincón MÁ, Espinosa A, Echeverria F, Romero N, Mañan DG, Videla LA. Molecular mechanisms related to the hepatoprotective effects of antioxidant-rich extra virgin olive oil supplementation in rats subjected to short-term iron administration. Free Radical Biology and Medicine. 2018; 126: 313-21.

Bastos DZ, Pimentel IC, de Jesus DA, de Oliveira BH. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. Phytochemistry. 2007; 68(6): 834-9.

Bati B, Celik I, Dogan A. Determination of hepatoprotective and antioxidant role of walnuts against ethanol-induced oxidative stress in rats. Cell biochemistry and biophysics. 2015; 71(2): 1191-8.

Baynes JW, Dominiczak MH. Medical Biochemistry. 3rd edn. London: Mosby Elsevier limited; 2009.

Beutler E, Dubon OB, Kelly M. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 1963; 61: 882-8.

Butt MA, Ahmad M, Fatima A, Sultana S, Zafar M, Yaseen G, Kayani S. Ethnomedicinal uses of plants for the treatment of snake and scorpion bite in Northern Pakistan. Journal of ethnopharmacology. 2015; 168: 164-81.

Cadenas E, Sies H. The lag phase. Free radic res. 1998; 28(6): 601-9.

Chatzigeorgiou S, Thai QD, Tchoumtchoua J, Tallas K, Tsakiri EN, Papassideri I, Trougakos IP. Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*. Phytomedicine, 2017; 33: 53-61.

Chen X, Ying X, Sun W, Zhu H, Jiang X, Chen B. The therapeutic effect of fraxetin on ethanol induced hepatic fibrosis by enhancing ethanol metabolism, inhibiting oxidative stress and modulating inflammatory mediators in rats. International Immunopharmacology. 2018; 56: 98-104.

Das M, Basu S, Banerjee B, Sen A, Jana K, Datta G. Hepatoprotective effects of green *Capsicum annum* against ethanol induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2018; 227: 69-81.

Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest*. 2002; 22: 51-65.

Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. The triangle of death in Alzheimer's disease brain: the aberrant cross-talk among energy metabolism, mammalian target of rapamycin signaling, and protein homeostasis revealed by redox proteomics. *Antioxidants Redox Signal*. 2017; 26: 364-87.

Dimas K, Demetzos C, Mitaku S, Marselos M, Tzavaras T, Kokkinopoulos D. Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines in vitro. *Pharmacological research*. 2000; 41(1): 83-6.

Ding T, Tian S, Zhang ZX, Gu DZ, Chen YF, ve ark. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pharmacol. Biomed. Anal*. 2001; 26(1): 155-61.

Dogan A, Arihan O, Erkec OE, Celik I. Protective effects of omega-3 against acute tributyltin toxicity in rats. *Fresenius environmental bulletin*. 2017; 26(4): 3067-76.

Dogan A, Celik I. Hepatoprotective and antioxidant activities of grapeseeds against ethanol-induced oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*. 2012; 107(1): 45-51.

Dogan A, Dalar A, Sadullahoglu C, Battal A, Uzun Y, Celik I, ve ark. Investigation of the protective effects of horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Molecular Biology Reports* 2018; 45(5); 787-97.

Dönmez İ. Lipophilic and hydrophilic extractives from strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.) and oriental plane (*Platanus orientalis* L.) wood. *Applied ecology and environmental research*. 2018; 16(1): 741-7.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research & Health*. 2007; 30(1): 5-13.

Elkomy NMIM, Ibrahim IAAEH, Elshazly SM, El-Fayoumi HM. Ameliorative effects of clonidine on ethanol induced kidney injury in rats: Potential role for imidazoline-1 receptor. *European Journal of Pharmacology*. 2018; 824: 148-56.

Erat M. İnsan Ve Sığır Eritrosit Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması, Bazı İlaç ve Kimyasal Maddelerin İnhibisyon veya Aktivasyon Etkilerinin Araştırılması [Doktora tezi]. Erzurum: Atatürk üniversitesi; 2002.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev. Biochem. 1995; 64: 97-112.

Fuchs EC, Weyhenmeyer R, Weiner OH. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. Arzneimittelforschung. 1997; 47: 1383-7.

García-Ramírez M, Turch M, Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Silymarin prevents diabetes-induced hyperpermeability in human retinal endothelial cells. Endocrinol Diabetes Nutr. 2018; 65(4): 200-5.

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007; 8(9): 722-8.

Gonzalez DH, Kuang XM, Scott JA, Rocha GO, Paulson SE. Terephthalate Probe for Hydroxyl Radicals: Yield of 2-Hydroxyterephthalic Acid and Transition Metal Interference. Analytical Letter. 2018; 1-10.

Gutteridge JM, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success?. Biochemical and biophysical research communications. 2018; 502: 183-5.

Gürdöl F. Tıbbi Biyokimya. 2. Baskı. İstanbul: Nobel matbaacılık; 2016.

Haider S, Nazreen S, Alam MM, Hamid H, Alam MS. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Platanus orientalis* Linn. and its ulcerogenic risk evaluation. Journal of ethnopharmacology. 2012; 143(1): 236-40.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 5 ed. USA: Oxford University Press; 2015.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Auroma OI. Free radicals and antioxidants in food in vivo: what they do and how they work. Critical Rew. Food. Sci. Nutrit. 1995; 35: 7-20.

Halliwell B, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem. J.* 2007; 401: 1-11.

Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996; 25: 57–74.

Hayes JD, Pulford DJ. The Glutathione S-Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995; 30: 445-600.

Hollingworth RM, Dong K. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM. Eds. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. UK: CAB International Wallingford; 2008.

Hong CY, Wang CP, Lo YC, Hsu FL. Effect of flavan-3-ol tannins purified from *Camellia sinensis* on lipid peroxidation of rat heart mitochondria. *Am J Chin Med.* 1994; 22: 285-92.

Hoshika Y, Carriero G, Feng Z, Zhang Y, Paoletti E. Determinants of stomatal sluggishness in ozone-exposed deciduous tree species. *Science of the Total Environment.* 2014; 481: 453-8.

Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes.* 1989; 38(12):1539–43.

Janković B, Dodevski V, Stojmenović M, Krstić S, Popović J. Characterization analysis of raw and pyrolyzed plane tree seed (*Platanus orientalis* L.) samples for its application in carbon capture and storage (CCS) technology. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2018; 133(1): 465-80.

Joshi S, Peck AB, Khan SR. NADPH oxidase as a therapeutic target for oxalate induced injury in kidneys. *Oxid Med Cell Longev.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/462361>.

Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67: 175-81.

Keha E, Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya*. Erzurum: Aktif yayınevi; 2004.

Khosropour E, Attarod P, Shirvany A, Pypker TG, Bayramzadeh V, Hakimi L, Moeinaddini M. Response of *Platanus orientalis* leaves to urban pollution by heavy metals. *Journal of Forestry Research*. 2017; 1-9.

Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi*. 1986; 11: 59-76.

Kocaman N, DÖ D. Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. *Firat Med J*. 2015; 20(3): 128-32.

Kong JM, Goh NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2003; 24(1): 7-21.

Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 2005; 12(22): 2601-23.

Latief U, Ahmad R. Herbal remedies for liver fibrosis: A review on the mode of action of fifty herbs. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2018; 8(3): 352-60.

Li Y, Liu YZ, Shi JM, Jia SB. Alpha lipoic acid protects lens from H₂O₂-induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pac J Trop Med*. 2013; 6: 548–51.

Liu H, Smith AJ, Lott MC, Bao Y, Bowater RP, ve ark. Sulforaphane can protect lens cells against oxidative stress: implications for cataract prevention. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54: 5236–48.

Liu LQ, Fan ZQ, Tang YF, Ke ZJ. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis via inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity in vitro. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*. 2014; 38(3): 683-693.

Lizzio KP. *Embattled saints: My year with the Sufis of Afghanistan*. Quest Books. 2014.

Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Altern Med Rev*. 1998; 3: 410-21.

Mahvi AH, Nouri J, Omrani GA, Gholami F. Application of *Platanus orientalis* leaves in removal of cadmium from aqueous solution. *World Applied Sciences Journal*. 2007; 2(1): 40-4.

- Majeed A, Ullah W, Anwar AW, Shuaib A, Ilyas U, Khalid P, Mustafa G, Junaid M, Faheem B, Ali S. Cost-effective biosynthesis of silver nanoparticles using different organs of plants and their antimicrobial applications: A review. *Materials Technology*. 2018; 33(5): 313-20.
- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, ve ark. Nomenclature for glutathione transferases. *Biochem. J*. 1992; 282(1): 305-6.
- Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione S-transferase (human placenta). *Methods Enzymol*. 1981; 77: 231–5.
- Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide-Dismutase (Sod)-Catalase Conjugates - Role of Hydrogen-Peroxide and the Fenton Reaction in Sod Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 416-20.
- Marrazzo G, Bosco P, La Delia F, Scapagnini G, Di Giacomo C, ve ark. Neuroprotective effect of silibinin in diabetic mice. *Neurosci Lett*. 2011;504(3):252-6.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 1969; 244: 6049–53.
- McCullough AJ, O'Connor JF. Alcoholic liver disease: Proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. *American Journal of Gastroenterology*. 1998; 93(11): 2022–36.
- Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact*. 1994; 91: 51-63.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(1): 95-108.
- Mirsadraee M, Tavakoli A, Ghorani V, Ghaffari S. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Platanus orientalis* extracts on asthmatic subjects resistant to routine treatments. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2018; 1-11.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VM. *Harper’s Biochemistry*. 25. Baskı. USA: McGraw-Hill Press; 2000.
- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. *Çevirenler: Menten G, Ersöz B. Harper’in Biyokimyası*. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993.

Nath P, Yadav AK. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the methanolic extract from leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* L. in mice. Journal of intercultural ethnopharmacology. 2015; 4(1): 70-3.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). Alcohol Alert: Alcohol Metabolism. No. 35, PH 371. Bethesda, MD: the Institute, 1997.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. USA: Worth Publishers; 2000.

Ntchapda F, Abakar D, Kom B, Nana P, Hamadjida A, Dimo T. Acute and sub-chronic oral toxicity assessment of the aqueous extract leaves of *Ficus glumosa* Del.(Moraceae) in rodents. Journal of intercultural ethnopharmacology. 2014; 3(4): 206-13.

Nwozo SO, Ajagbe AA, Oyinloye BE. Hepatoprotective effect of *Piper guineense* aqueous extract against ethanol-induced toxicity in male rats. Journal of Experimental & Integrative Medicine. 2012; 2(1): 71-6.

Ozkol H, Bulut G, Balahoroglu R, Tuluce Y, Ozkol HU. Protective Effects of Selenium, N-Acetylcysteine and Vitamin E Against Acute Ethanol Intoxication in Rats. Biol Trace Elem Res. 2017; 175: 177–85.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967; 70: 158–69.

Pazouki N, Sankian M, Leung PT, Nejadstari T, Khavari-Nejad RA, Varasteh AR. Identification of cyclophilin as a novel allergen from *Platanus orientalis* pollens by mass spectrometry. Journal of bioscience and bioengineering. 2009; 107(2): 215-7.

Perl-Treves R, Perl A. Molecular Oxygen and Its Reactive Derivates. Oxidative stress in plants. Taylor & Francis Inc., London. 2002;1-31.

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. Current medicinal chemistry. 2004; 11(9): 1163-82.

Rizzi R, Caroli A, Bolla P, Acciaioli A, Pagnacco G. Variability of reduce glutathione levels in massese ewes and its effect on daily milk production. J. Dairy Research. 1988; 55: 345-53.

Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001; 61: 2035-63.

Saraçoğlu İA. Osteoarthritis, Gout and Antidepressant Effects of *Platanus anatolius* versus *Platanus orientalis*. *Science Signpost Publishing*. 2018; 72-84.

Scibior D, Czczot H. Katalaza–budowa, właściwości, funkcje [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006; 60: 170-80.

Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, ve ark. Oxidative damage in Parkinson disease: measurement using accurate biomarkers. *Free Radic. Biol. Med*. 2010; 48(4): 560-6.

Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Research & Health*. 2007; 30(1): 38–47.

Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biological Chemistry*. 2006; 387: 349–60.

Sies H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. *Current Opin Toxicol*. 2018; 7: 122-6.

Song H, Bao J, Wei Y, Chen Y, Mao X, Li J, Yang Z, Xue Y. Kaempferol inhibits gastric cancer tumor growth: An in vitro and in vivo study. *Oncology reports*. 2015; 33(2): 868-74.

Song W, Dang Q, Xu D, Chen Y, Zhu G, Wu K, Zeng J, Long Q, Wang X, He D, Li L. Kaempferol induces cell cycle arrest and apoptosis in renal cell carcinoma through EGFR/p38 signaling. *Oncology reports*. 2014; 31(3): 1350-6.

Stoop JM, Williamson JD, Pharr DM. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*. 1996; 1(5): 139-44.

Süleyman H, Gül V, Erhan E. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*. 2018; 1(1): 1-4.

Tania UH, Hassan MR, Eshita NJ, Akhter R, Shahriar M. Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo pharmacological activity of leaf extracts of *Hoya parasitica* (Wall.). *J. Appl. Pharm. Sci*. 2016; 6: 163-70.

Tantry MA, Akbar S, Dar JA, Irtiza S, Galal A, Khuroo MA, Ghazanfar K. Acylated flavonol glycoside from *Platanus orientalis*. *Fitoterapia*. 2012; 83(2): 281-5.

Tuzlacı E, Erol MK. Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta) 1. *Fitoterapia*. 1999; 70(6): 593-610.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1-2): 41-54.

Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006; 160(1): 1-40.

Vessal G, Akmalı M, Najafı P, Moein MR, Sagheb MM. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail*. 2010; 32: 733-9.

Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Research & Health*. 2007; 30(1): 48–54.

Yayalacı Y, Celik I, Batı B. Hepatoprotective and antioxidant activity of linden (*Tilia platyphyllos* L.) infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. *The Journal of membrane biology*. 2014; 247(2): 181-8.

Yurt B, Celik I. Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49: 508–13.

Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96: 7490-5.

Zima T, Fialova L, Metsek O, Janebová M, Crkovská J, ve ark. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*. 2001; 8(1): 59–70.

ÖZGEÇMİŞ

Özgür Ozan ANUK 1991 yılında Yüksekova'da doğdum. Liseyi Şemsettin Onay lisesinde 2007 yılında bitirdim. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fizyoterapi ve Rehabilitasyon bölümüne 2008 senesinde yerleştim ve 2014 senesinde uzatmalı olarak bitirdim. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında 2016 Eylül ayında yüksek lisansa başladım Ekim 2018 tarihinde mezun oldum.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Raporu





T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KEŞİN SONUÇ ONAY BELGESİ

VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmannın Adı <i>Title of the Research</i>	Etil Alkol İle Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Çınar (<i>Platanus orientalis</i>) Yaprak İnfüzyonunun Doku Koruyucu Rolü Ve Fitokimyasal İçeriğinin Araştırılması Investigation of Tissue Protective Role and Phytochemical Composition of Plane-tree (<i>Platanus orientalis</i>) Leaf Infusion Against Ethanol-Induced Oxidative Stress In Rats	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOĞAN Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Özgür Ozan ANUK	
Araştırmannın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i> : 27.03.2018		
Araştırmannın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i> : 27.09.2019		
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i> : 18 Ay		
Proje No / <i>Project Number</i> : TYL-2018-6774		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available)</i> : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPSİS)		
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding</i> : Yüksek Lisans Projesi, 6429,20 (TL)		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27/09/2018 tarih ve 2018/09 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 27/09/2018 (decision number 2018/09).		
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE ÜYE	
 Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL ÜYE	 Prof. Dr. Siddik KESKİN ÜYE	 Prof. Dr. Suphi DENİZ ÜYE
 Prof. Dr. Nalan ÖZDAL ÜYE	 Doç. Dr. Atilla DURMUŞ ÜYE	 Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN ÜYE
 Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Oruc ALLAHVERDİYEV ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Canser Yılmaz DEMİR ÜYE
 Dr. Öğr. Üyesi Hacer ŞAHİN AYDIN YURT ÜYE	 Dr. Öğr. Üyesi Şükra ÖNALAN ÜYE	 Vet. Hek. Kerem OĞRAK ÜYE
 Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET ÜYE	 Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU ÜYE	

EK 2. Tez Orijinallik Raporu

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih:22/10/2018	
<p>Tez Başlığı / Konusu: ETİL ALKOL İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ÇINAR (<i>Platanus orientalis</i> L.) YAPRAK İNFÜZYONUNUN DOKU KORUYUCU ROLÜ VE FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN ARAŞTIRILMASI Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 39 sayfalık kısmına ilişkin. 22/10/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından iThenticate intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 7 (yüzde yedi) dir.</p> <p>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) <p>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p> <p style="text-align: center;"> Özgür Ozan ANUK 22.10.2018</p>	
Adı Soyadı: Özgür Ozan ANUK Öğrenci No:16930006003 Anabilim Dalı: Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Programı: Statüsü: Y.Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  Dr. Öğr. Üyesi Abdulahad DOĞAN (Unvan, Ad Soyad, İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR  Prof. Dr. Servet DEDE Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Unvan, Ad Soyad, İmza)