



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISIRGAN OTU (*Urtica dioica* L.) TOHUMU EKSTRESİNİN, AKUT
KARBON TETRAKLORÜR UYGULANAN ALBİNO SIÇANLARDA
PLAZMA VE KARACİĞER LİPİD PEROKSİDASYONU İLE
GLUTATYON DÜZEYLERİNE ETKİSİ

AYŞEGÜL GÜMÜŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. ERTUĞRUL YURTSEVER

İSTANBUL-2007

I. Teşekkür

Çalışmalarım sırasında desteğini benden eksik etmeyen değerli hocam ve anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. K.Turay YARDIMCI' ya, Prof.Dr. Fikriye URAS'a her konuda maddî ve manevî desteğini esirgemeyen, tezimin her aşamasında engin bilgileriyle bana yardımcı olan değerli hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul YURTSEVER' e sonsuz teşekkür ederim.

Histolojik çalışmalardaki katkısından dolayı Prof. Dr. Serap ARBAK'a, tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, beni yönlendiren ve tezimin her aşamasında yanımda yer alarak çalışmalarımın bu aşamaya gelmesini sağlayan değerli hocalarım, başta Doç.Dr. Azize ŞENER ve Yrd.Doç.Dr. Bahar GÖKER'e ve deney hayvanlarının kesim aşamasında, tecrübeleri ile bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen Uz. Biyolog Arif GÜMÜŞ'e, teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca ders aldığım dönemlerde ve tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan ve engin bilgilerini esirgemeyen tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayşegül GÜMÜŞ

I. İÇİNDEKİLER

I	Teşekkür	
II	İçindekiler	
III	Kısaltmalar	
IV	Şekil, Resim ve Tabloların Listesi	
	i. Şekillerin Listesi	
	ii. Resimlerin Listesi	
	iii. Tabloların Listesi	
	iv. Grafiklerin Listesi	
II	İÇİNDEKİLER	
1.	ÖZET	1
2.	SUMMARY	2
3.	GİRİŞ VE AMAÇ	4
4.	GENEL BİLGİLER	5
4.1	Serbest Radikallerin Tarihçesi ve Özellikleri	5
4.1.1	Serbest Radikal Kaynakları	8
4.2	Lipid Peroksidasyonu	10
4.3	Karbon Tetraklorür ve Etki Mekanizması	13
4.4	Antioksidanlar	15
4.4.1	Antioksidanların Sınıflandırılması	18
4.5	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)'nun Tarihçesi	22
4.6	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)'nun Taksonomik ve Morfolojik Özellikleri.	23
4.7	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)'nun Kimyasal Özellikleri	27
4.8	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)'nun Tibbî Tedavideki Önemi	30
4.9	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)'nun Antioksidan Özellikleri	31
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
5.1	Gereçler	35
5.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
5.1.2	Yararlanılan Alet ve Cihazlar	36
5.1.3	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	37
5.1.4	Kullanılacak Ekstrenin Hazırlanması	38
5.1.5	Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Beslenmeleri	39
5.2	Yöntem	40
5.2.1	Hayvan Çalışmaları	40
5.2.2	Karaciğerde Yapılan İncelemeler	40
5.2.3	Karaciğer Lipid Peroksit Düzeyinin Ölçülmesi	41
5.2.4	Karaciğer Glutatyon Düzeyinin Ölçülmesi	41
5.2.5	Plazmada Yapılan İncelemeler	42
5.2.6	Plazmada Lipid Peroksit Düzeyinin Ölçülmesi	42
5.2.7	Plazma ALT ve AST Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi	42
5.2.8	Histolojik Çalışmalar	43
5.2.9	Lowry Metodu ile Protein Tayini	43
5.2.10	İstatistiksel Değerlendirme	44

6	BULGULAR	45
6.1	Plazmada Yapılan Biyokimyasal İncelemelerde Elde Edilen Bulgular	45
6.2	Karaciğer Lipid Peroksidasyon ve GSH Düzeyleri İle İlgili Elde Edilen Bulgular	48
6.3	Histolojik Çalışmalar İle İlgili Elde Edilen Bulgular	50
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8	KAYNAKLAR	56
9	ÖZGEÇMİŞ	70
10	ETİK KURUL ONAYI	71

II. Kısaltmalar

A	: Absorbans
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
AOH:	: Antioksidan
BPH	: Benign Prostatic Hyperplasia
CCl ₃	: Triklorometil Radikali
C-Cl	: Karbon-Klor Bağı
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CCl ₄	: Karbon Tetra Klorür
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş)
GSSG	: Glutasyon disülfid
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
MDA	: Malondialdehit
mL	: Mili Litre
µL	: Mikro Litre
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinukleotid (yükseltgenmiş, form)
NADH	: Nikotinamid adenin dinukleotid (indirgenmiş, form)
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (yükseltgenmiş, form)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (indirgenmiş, form)
Na ₂ HP0 ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
RPM	: Dakikada Devir Sayısı (Rotation Per Minute)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TEP	: 1,1,3,3 - Tetra etoksipropan
UDA	: Urtica dioica Agglutunin
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein

III. Şekil, Resim ve Tabloların Listesi

i. Şekillerin Listesi

Şekil 1	Serbest radikallerin hücresel hasar yapma mekanizması
Şekil 2	Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu
Şekil 3	Serbest radikal saldırılarına karşı antioksidan savunma sistemleri
Şekil 4	Antioksidanların sınıflandırılması
Şekil 5	Histamin, Serotonin, Betain
Şekil 6	Ekstrenin hazırlanması

ii. Resimlerin Listesi

Resim 1	<i>Urtica dioica</i> L.
Resim 2	<i>Urtica urens</i> L.
Resim 3	<i>Urtica pilulifera</i> L.
Resim 4	<i>Urtica cannabina</i> L.
Resim 5	<i>Urtica membranacea</i> Poir.
Resim 6	Kontrol grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü
Resim 7	Karbon tetraklorür grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü
Resim 8	Ekstre grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü
Resim 9	Karbon tetraklorür+ekstre grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü

iii. Tabloların Listesi

Tablo 1	Reaktif oksijen türleri
Tablo 2	Reaktif azot türleri
Tablo 3	Antioksidanların sınıflandırılması
Tablo 4	Isırgan otunun, tohum, yaprak ve çiçeklerinin vitamin düzeyleri
Tablo 5	Tohum, çiçek ve yaprakların mineral düzeyleri (mg/100gr)
Tablo 6	Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler
Tablo 7	Araştırmada kullanılan cihazlar
Tablo 8	Grupların plazma AST ve ALT değerleri
Tablo 9	Grupların plazma ürik Asit ve BUN değerleri
Tablo 10	Grupların plazma glukoz, albumin, total protein değerleri
Tablo 11	Grupların plazma trigliserit, kolesterol, VLDL değerleri
Tablo 12	Grupların plazma magnezyum, kalsiyum, fosfor değerleri
Tablo 13	Grupların karaciğer glutatyon, karaciğer MDA ve plazma MDA değerleri

iv. Grafiklerin Listesi

Grafik 1	Bovin serum albumin standart grafiği
Grafik 2	Grupların plazma AST düzeyleri
Grafik 3	Grupların plazma ALT düzeyleri
Grafik 4	Grupların karaciğer glutatyon düzeyleri
Grafik 5	Grupların karaciğer MDA düzeyleri
Grafik 6	Grupların plazma MDA düzeyleri

1. ÖZET

Bu çalışmada sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl₄) uygulamasının neden olduğu karaciğer hasarına bağlı karaciğer lipid peroksidasyonu artışı ve glutatyon tüketimi üzerine ısırgan otu tohumunun etanol ekstresinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 200-220g ağırlığında 28 adet Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı. Kontrol grubu (grup1), CCl₄ grubu (grup 2), ekstre grubu (grup 3) ve ekstre + CCl₄ grubu (grup 4) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Isırgan tohumlarının toz haline getirildikten sonra (%96) etanol ekstraksiyonu ile hazırlanan ekstre, deney hayvanlarına 14 gün süresince her gün intra peritoneal (i.p.) olarak 300µl enjekte (1g/kg) edildi. 15. günde 16- 18 saat aç bırakılan sıçanlardan 2. ve 4. grup sıçanlara tek doz (1 ml/kg) CCl₄'ün zeytinyağındaki % 20' lik çözeltisi, 1. ve 3.grup sıçanlara ise aynı hacimde zeytinyağı i.p. olarak uygulandı. 2 saat sonra ketamin anestezisi altında sıçanların kalplerinden kan örnekleri alındı. Daha sonra öldürülen sıçanların karaciğerleri çıkarıldı ve karaciğer lipid peroksit seviyeleri (MDA) ile karaciğer glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü. Alınan kan örneklerinde ise plazma lipid peroksit seviyeleri, plazma alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) enzim aktiviteleri ve diğer biyokimyasal parametreler otoanalizör ile karaciğer ve plazma lipid peroksidasyonu tiobarbütürik asit, karaciğer glutatyon düzeyleri ise Ellman yöntemi ile ölçüldü.

4. grup sıçanların CCl₄ grubu sıçanlarına oranla plazma lipid peroksit, ALT ve AST düzeyleri azalmıştır. Aynı zamanda 4. grup sıçanların karaciğer lipid peroksit düzeyleri CCl₄ uygulanan gruba göre düşmüştür. Ekstre uygulanması karaciğer lipid peroksit düzeylerini kontrol grubuna göre azaltırken, plazma lipid peroksit düzeyleri kontrol grubu düzeylerinde kalmıştır. Sadece ekstre verilen sıçanların karaciğer GSH düzeyleri kontrol grubuna göre %21.3 artmıştır. Ekstre+CCl₄ verilen grubun GSH düzeyleri ise CCl₄ grubuna göre değişiklik göstermemiştir. Histolojik çalışmalarda ekstre uygulanan grupta normale yakın karaciğer yapısı gözlenirken, CCl₄ uygulaması hepatositlerde ileri derecede harabiyete neden olmuştur. 14 gün ekstre uygulanan sıçanlarda CCl₄ uygulamasından sonra CCl₄'e bağlı karaciğer harabiyetinin hafif derecede olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak ısırgan otu tohumunun etanol ekstresinin CCl₄'e bağlı olarak artan karaciğer enzimlerinin düzeylerini ve karaciğer lipid peroksidasyonu düzeylerini azalttığı görülmüştür. Ekstre CCl₄'ün hepatoksik etkisini azaltarak antioksidan etki göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Glutatyon, Isırgan otu tohumu, Malondialdehit

2. SUMMARY

THE EFFECT OF (*Urtica dioica* L.) SEED EXTRACT ON PLASMA AND LIVER LIPID PEROXIDATION AND LIVER LEVELS GLUTATHIONE IN ALBINO RATS ACUTE CARBON TETRACHLORIDE TREATMENT

In this study, the inhibitory effect of *Urtica Dioica* L. (stinging nettle) seeds extract on lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride in rats were investigated. 28 Wistar albino female rats each, 200-220g in weight were used. The 4 groups were named as: control group (group 1), carbon tetrachloride group (group 2), extract group (group 3) and extract + carbon tetrachloride group (group 4).

Stinging nettle seeds were pulverized and ethanol extract was prepared. Group 3 and group 4 received injections of ethanol extract of the seed for 14 days. Each day 300µl (1g/kg) of the extract was injected intraperitoneally (i.p.). After starvation for 16-18 hours on the 15th day to the rats in group 2 and group 4 20% CCl₄ solution in olive oil (1 ml/kg) were injected. The control and extract group received olive oil at equal volumes (1 ml/kg) i.p. To the rats, 2 hours later, mild ketamine anaesthesia were performed. Plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) enzyme activities and other biochemical parameters were measured by autoanalyser in blood samples taken from the hearts while they are in ketamine treatment anaesthesia. The rats were killed after 2 hours of the treatment. Plasma and liver lipid peroxide levels were measured with thiobarbituric acid (TBA) test; and liver glutathione levels were measured with Ellman method.

In group 4 compared to controls there was a decrease in plasma lipid peroxidation, ALT enzyme activities and liver lipid peroxidation levels. No change between control groups but was observed increase in carbon tetrachloride group. Injection with the extract has increased liver lipid peroxidation but it had no effect on plasma lipid peroxidation level nearly control group's level. Extract groups rats glutathione levels compared to the control group showed 21.3% decrease. Carbon tetrachloride +extract group showed change on glutathione levels from carbon tetrachloride group.

In histological experiments extract group showed normal liver structure. But carbon tetrachloride group showed exceedingly hepatosis damage. After injection of the

ethanol extract of the seed 14 days. Extract group 4th decrease the hepatosit damage which caused by carbon tetrachloride (CCl₄).

Inconclusion ethanol extract of the *Urtica dioica* L. seed decreased the levels of liver enzymes(ALT and AST) and lipid peroxidation induced by CCl₄. Upon treatment with seed extract, the capasity of antioxidant effect in liver was increased.

Key Words: Antioxidant, Glutathione, Stinging nettle seed, Malondialdehyde

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hastalık etkenlerinin dünyanın varoluşu ile birlikte dünya üzerinde oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla ilk insanların dahi hastalıklara karşı bir korunma yöntemi olduğu düşünülmektedir. Tarih öncesi dönemlerden günümüze, zengin bir floraya sahip Anadolu'da, hastalıklara karşı bitkiler tedavi amaçlı uygulanmaktadır. Günümüzde de, özellikle son 20 yılda bu alanda çok sayıda deneysel çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Özellikle ABD ve Avrupa'da bitkisel ve doğal ürünlere artan bir ilgi gözlenmektedir. Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmaların ışığında, bitkisel besinlerden zengin beslenmenin kanser ve ateroskleroz gibi kronik bir takım hastalıkların gelişimini azaltabileceği söylenmektedir.

Son yıllarda fizyolojik ve patolojik olarak önemli fonksiyonlar üstlendikleri düşünülen serbest radikaller ile bunlara karşı savunma mekanizmaları oluşturan bileşikler olan antioksidanlara ilgi çok artmıştır. Bazı bitkiler antioksidan madde içeriği bakımından zengindir. Tedavi amaçlı olarak çok eski dönemlerden beri kullanılan ısırgan otunun yaprak, tohum ve çiçeklerinin de antioksidanlar açısından zengin bir içeriğe sahip olduğu bilinmektedir.

Antioksidan, antimikrobial, antiülser gibi aktivitelere sahip olan ısırgan otunun (1) yapılan literatür taramasında; deney hayvanlarında ısırgan otu yapraklarının CCl₄'e bağlı olarak değişen alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve karaciğer glutatyon düzeylerine etkisinin incelendiği çalışmalar bulunmasına rağmen, ısırgan tohumu etanol ekstresinin bu parametreler üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle; çalışmamızda, halk arasında sıklıkla kullanılan ve antioksidan vitamin ve mineraller açısından zengin olan ısırgan otu tohumunun etanol ekstresinin, karbon tetraklorürün oluşturduğu karaciğer hasarına bağlı olarak gelişen lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Serbest Radikallerin Tarihçesi ve Özellikleri

Serbest radikaller ile ilgili çalışmalar Gomberg'in 1900'lü yıllarda trifenilmetil radikalının ($\text{Ph}_3\text{C}^\cdot$) varlığını ispatlamasıyla başladı. Gomberg'e göre bir serbest radikal bağımsız olarak varolabilen, en dış orbitalinde ortaklanmamış bir veya daha fazla sayıda elektron içeren atom, atom grupları veya moleküllerdir. Bu tanımlamaya göre basit bir serbest radikal, hidrojen atomudur ve en dış orbitalinde iki adet ortaklanmamış elektron bulduran moleküler oksijen örnektir (2- 8). Radikallerin reaktiveteleri farklılık arz etmesine rağmen, genellikle nonradikallerden daha az stabildirler. En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Serbest radikaller, pozitif veya negatif yük taşıyabildikleri gibi, yüksüz de olabilirler (9- 12).

Bir bileşik üç şekilde serbest radikal haline gelebilir. Bunlardan;

- ✓ İlave bir elektron alınması
- ✓ Elektron kaybedilmesi
- ✓ Kovalent bağın simetrik kırılması sonucu iki fragmentin birer elektron kazanmasıyla serbest radikal haline geldikleri homolitik bağın kırılması ile gerçekleşmektedir (5, 9).

Organizmalardaki birçok molekül, ortaklanmamış elektron içermediğinden meydana gelen serbest radikal, radikal olmayan moleküllerle reaksiyona gireceğinden, yeni serbest radikaller meydana gelecektir. Radikallerin reaksiyonları üç evreye ayrılmaktadır. Bunlar: başlama, ilerleme, bitiş reaksiyonlarıdır ve bu reaksiyonlar, zincir reaksiyonları şeklinde meydana gelmeye eğilimlidirler (2, 5).

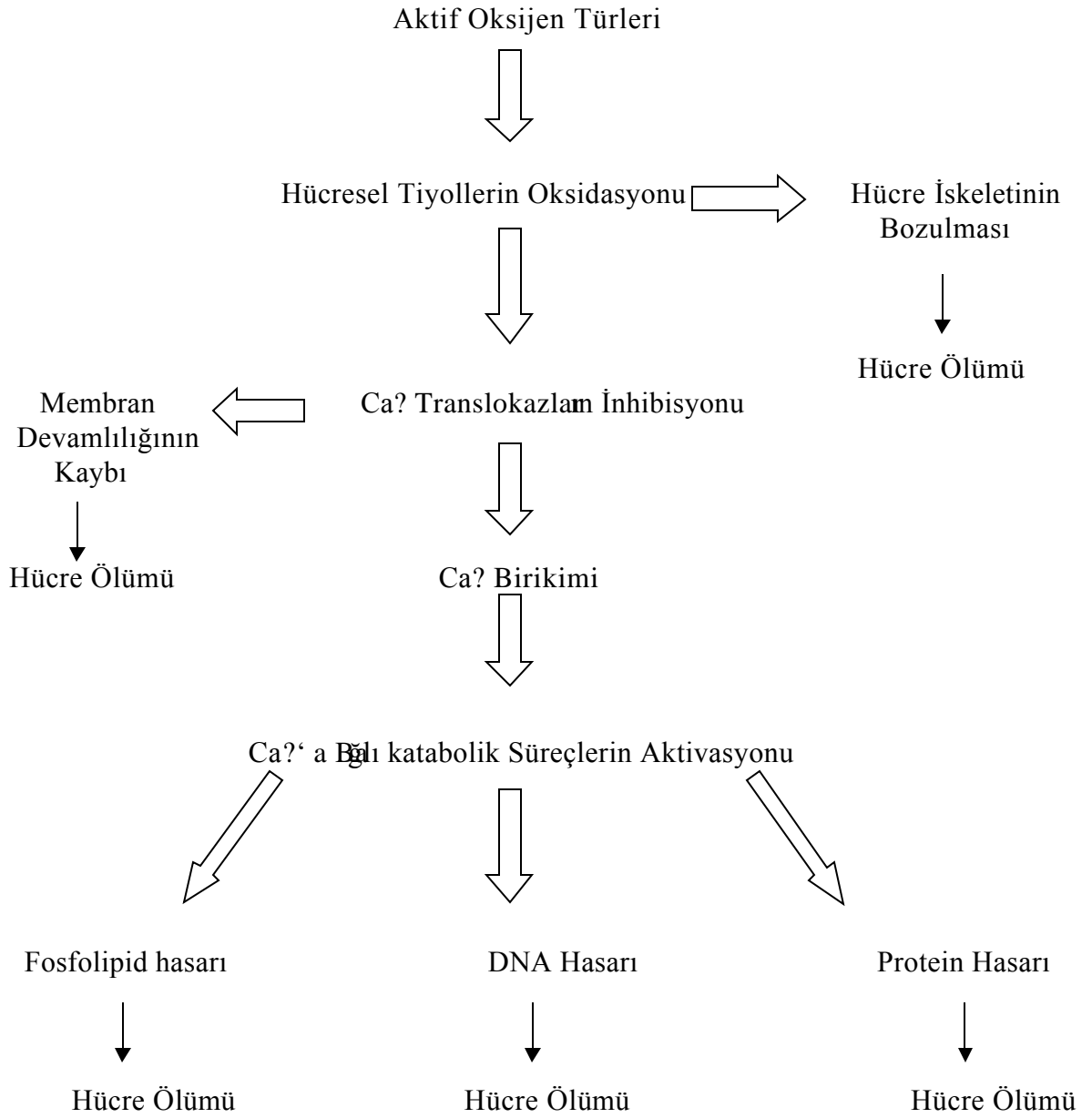
Radikallerin reaktivitesi oldukça değişken olmasına rağmen, radikaller radikal olmayan yapılara göre daha az kararlıdır. Radikaller bir kez oluştuğlarında, hem başka radikallerle, hem de başka moleküllerle çeşitli etkileşimlerle reaksiyona girebilmektedirler. Bu reaksiyonların hızı ve seçiciliği, radikalın konsantrasyonunun yüksekliğine ve radikalın reaksiyona girebileceği molekülde zayıf bağların varlığına bağlıdır (3). Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç

toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (13- 16).

Serbest radikaller, hem oksidan, hem de uyarıcı ajan gibi görev yapabilir. İki radikal reaksiyona girdiğinde dengeli bir yapı meydana gelir. Fakat biyolojik sistemlerde bir radikalın, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girme olasılığı daha yüksektir. Böyle bir reaksiyon sonucunda başka serbest radikaller meydana gelir. Bu da binlerce reaksiyon uzunluğundaki zincir reaksiyonlarını uyarır. Çok doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu buna örnektir (9). Ticari hayatta önemli zararlara neden olan depo edilen yağlardaki ekşimelere serbest radikallerin neden olmasının anlaşılmasıyla radikal kimyasıyla gerçek anlamda ilgilenilmeye başlanmıştır (9).

İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek ürünler oluşabilmektedir (17). Bu durum da oksidatif strese neden teşkil etmektedir. Reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan temel faktörlerdendir (18) .

Serbest radikaller, pestisidlerin ve çevresel kimyasalların toksisitelerinde de önemli rol oynarlar. Pestisidler, oksidatif strese, serbest radikal üretimine, antioksidanlarda değişime yol açabilirler. Lipid peroksidasyonu, pestisidlerin neden olduğu zehirlenmelerde zehirlenme mekanizmalarından biri olarak belirtilmiştir (19). Canlılarda hidroksil (OH^\cdot), süperoksit (O_2^\cdot), nitrik oksit (NO^\cdot) ve peroksit (ROO^\cdot) gibi serbest radikaller oldukça önemlidir. Peroksinitrit (ONOO^\cdot), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\Delta_g \text{O}_2$) (bazen $^1\Delta_g$ veya $^1\text{O}_2$ yazılır) ve ozon (O_3) serbest radikal değildirler, fakat canlı organizmalarda kolayca serbest radikal reaksiyonlarında öncülük ederler. “Reaktif Oksijen Türleri” terimi sadece OH^\cdot , O_2^\cdot , NO^\cdot ve ROO^\cdot için değil, aynı zamanda ONOO^\cdot , HOCl , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ ve O_3 içinde kullanılmaktadır (20) .



Şekil 1: Serbest Radikallerin Hüresel Hasar Yapma Mekanizması (36)

4.1.1 Serbest Radikal Kaynakları

Tablo 1: Reaktif Oksijen Türleri (18)

Reaktif Oksijen Türleri	
Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit	Hidrojen peroksit
Hidrosi	Hipoklorik asit
Peroksi	Hipobromik asit
Alkoksi	Ozon
Hidroperoksi	Singlet oksijen

Serbest oksijen radikallerinin, ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonlar, kurşun zehirlenmesi, aminoglikozit nefrotoksisitesi, ağır metal nefrotoksisitesi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefrit, hepatit B, iskemi ve reperfüzyon, vitamin E eksikliği, kanser, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis ve romatoid artrit gibi pek çok hastalığın patogenezisinde etkili oldukları öne sürülmektedir (14, 21).

Tablo 2: Reaktif Azot Türleri (18)

Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Nonradikaller
Nitrik oksit	Nitroz asit
Azot dioksit	Nitrozil katyonu
	Nitroksi anyonu
	Dinitrojen tetraoksit
	Peroksinitrit
	Peroksinitril asit
	Nitronyum katyonu
	Alkilperoksi nitritler

Ozon, in vivo olarak üretilmeyen mavi gaz kümesi, atmosferde güneş radyasyonuna karşı önemli bir koruyucu olarak görev yapmaktadır. Dünyanın yüzeyine yakın olan ozon, istenmeyen bir oksidandır ve bir toksik hava kirleticisidir (22). Ozonun

biyolojik etkisi doğrudan biomoleküllerin oksidasyon veya peroksidasyonuna ya da her ikisine birden katkıda bulunmasıdır (23- 25). Ozona maruz kalan sıçanların beyinde, lipid peroksidasyonun bir indikatörü olarak tiobarbitürik asit oranında bir artış bulunmuştur (26). Çok zehirli bir madde olan siyanüre maruz kalmadan sonra, hücre sitoplazmasında 1- 2 saniye içerisinde peroksidler şekillenmiş ve birkaç dakikalık süre boyunca birikmeye devam etmiştir. Aynı zamanda siyanür, antioksidan savunma sistemlerini de inhibe etmiştir. Peroksid birikimi ve siyanürün neden olduğu hücre ölümü, askorbat ile durdurulmuştur (27).

Nitrik oksit, kan basıncı düzenleme ve trombosit agregasyonunu önleme gibi bazı faydalı fonksiyonlara sahiptir fakat aşırı üretimi toksik etkilere neden oluşturur. Aşırı NO üretiminin, kronik enflamasyon, kalp çarpıntısı ve septik şok gibi durumlara sebep olduğu ileri sürülmüştür (28). Nitrik oksit şaşırtıcı çeşitlilikteki biyolojik sistemlerde aracı olarak tanınır. Nörotransmitter gibi etki göstererek trombosit agregasyonunu engeller ve makrofaj fonksiyonlarında önemli rol oynar. İleri derecede toksiktir ve çok kısa ömürlüdür (29).

Hipoklorik asit bir serbest radikal değildir, fakat potansiyel bir oksitleme ve klorlama ajanıdır. Ayrıca hücre membranının bozulmasını sağlayan kolesterol klorohidrinlerinin formasyonuna katıldığı da tahmin edilmektedir (30). HOCl ayrıca primer aminlere, proteinlerin sülfhidril gruplarına da saldırmakta ve DNA'da pürin bazlarını kolay şekilde klorlayabilmektedir (31, 32) . Nötrofillerin yabancı organizmayı öldürmek için kullandığı mekanizmalardan biri de hipoklorik asit üretimidir (33). Hipoklorik asit ve ozon gibi hidrojen peroksit'te bir serbest radikal değildir.

Metabolizmadaki serbest haldeki demir ve iyonlarının gereğinden fazla bulunması durumu da en az serbest oksijen reaktifleri kadar hasar verebilmektedir (34, 35).

4.2. Lipid Peroksidasyonu

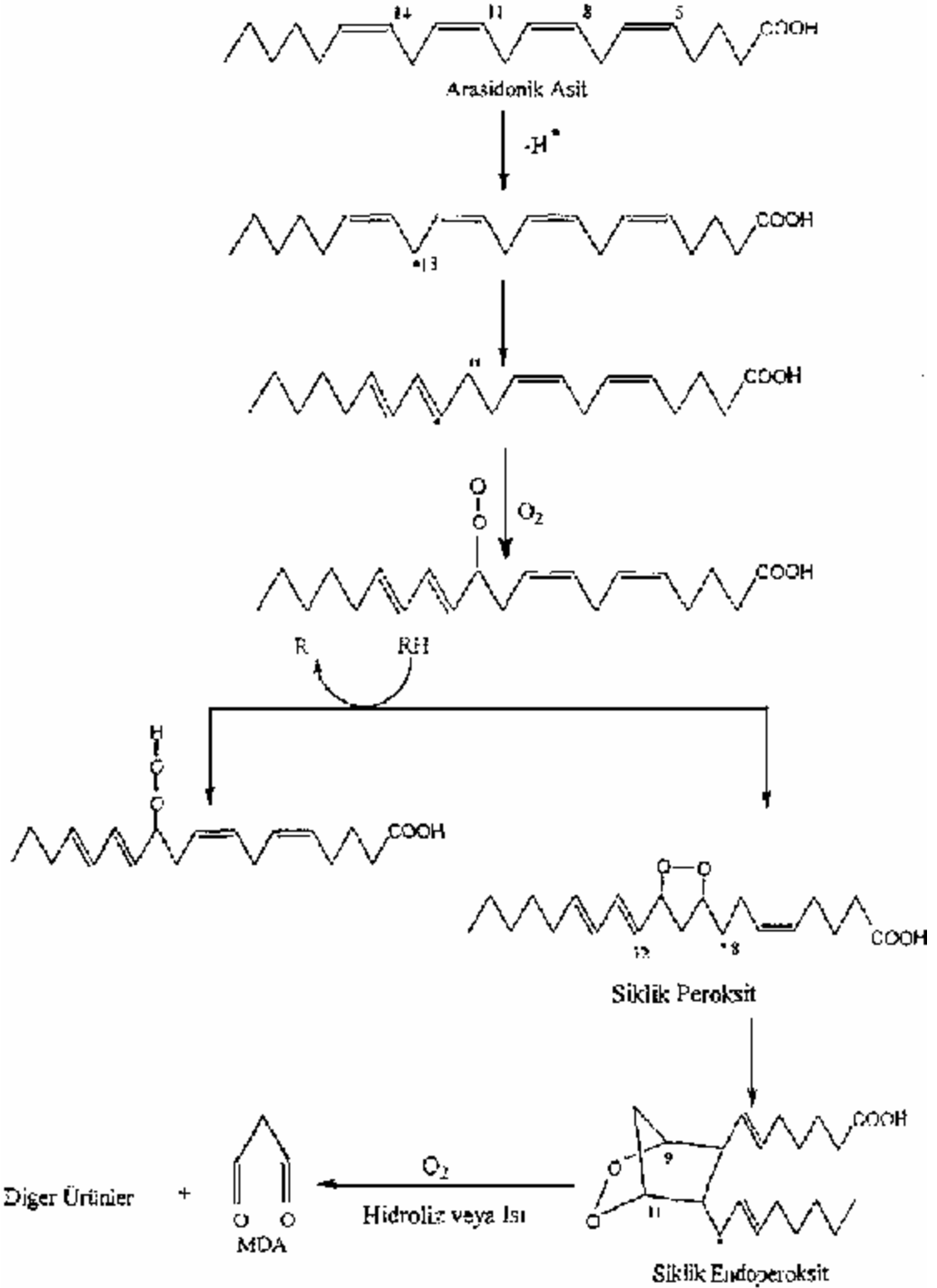
İnsan hücre membranları fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi için "akışkan" olmalıdır. Akışkanlığın büyük bir kısmı membran lipidlerinde bulunan çok doymamış yağ asidi yan zincirleriyle sağlanmaktadır. Bu çok doymamış yağ asidi yan zincirleri serbest radikal saldırılarına oldukça açıktır ve bu saldırılar sonucunda lipid peroksidasyonu başlamaktadır. Peroksidasyon, membran lipid ve proteinlerinde hasar meydana getirmektedir (5). Lipid peroksidasyonu zar fosfolipidlerindeki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (37, 38).

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA) nin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bu şekilde oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (39).

Peroksidasyona en duyarlı olan birimler, doymamış yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonunun mekanizması incelendiğinde reaktif serbest radikallerin, çok doymamış yağ asidi yan zincirlerinden hidrojen atomlarını koparttıkları görülmektedir. Hidrojen atomunun tek bir elektronu vardır ve yağ asidi omurgasına kovalent bağla bağlıdır. Radikaller, zar yapısındaki çok doymamış yağ asidi zincirinin α -metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırarak, lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. Bir hidrojen atomu koparılan karbonun ortaklanmamış bir elektronu kalmakta ve serbest radikal haline gelmektedir. Oluşan lipid radikali (L^{\cdot}) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle; molekül içi çift bağ aktarılması sonucunda dien konjugatları oluşur ve devam eden reaksiyonlarda; lipid radikalinin zarlarda çözülmüş olarak bulunan moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesinden lipid peroksil (LOO^{\cdot}) radikali meydana gelir. Son derece reaktif olan peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşmüş olurlar. Olay bu şekilde kendi kendine katalizlenerek devam eder (37, 39- 43).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar bu şekilde iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (44- 47).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi suretiyle son bulur. Oluşan metabolitlerden MDA, fosfolipidlerin, nükleik asitlerin veya proteinlerin amino gruplarına bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA miktarı, TBA (tiobarbütürik asit) testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (38- 40).

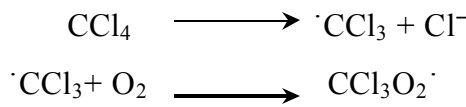


Şekil 2: Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu (20)

4.3. Karbon Tetraklorür ve Etki Mekanizması

Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların gerçekleşmesi esnasında oluşabildiği gibi, çeşitli ekzojen etkenlerin etkisi ile de oluşabilmektedir. Bu ekzojen etkenlerden birisi de karbon tetraklorürdür. (CCl₄). CCl₄ uygulamasından en fazla etkilenen organ, karaciğerdir (48- 53). Bundan dolayı CCl₄, klasik ve model bir hepatotoksikandır. Oksijen radikalleri, nükleik asitler, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi tüm kimyasal sınıftan bileşiği geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak hasara uğratabilme kapasitesindedir (9).

Kendi sınıfının en toksik maddesi olan karbon tetraklorür, hem likit hem de buhar olarak gastrointestinal sistem ve solunum sisteminde çok kolay absorbe edilebilen ve karaciğer başta olmak üzere beyin, böbrek, kan, kas ve yağ dokusunda yüksek oranlarda dağılan zehirli bir maddedir (42, 54- 56). Ancak karbon tetraklorürün en önemli toksik etkisi, sitokrom P₄₅₀ sisteminin en fazla yoğunlaştığı karaciğerin "santrobüler" bölgesindeki tek hücrenin ölümünden başlayarak tüm organ boyunca ağır ölümlere neden olabilecek şekilde gelişir (56, 57). Bu organik çözücü, sitokrom P₄₅₀ tarafından serbest radikale çevrilmektedir. Karbon-klor bağı kırılmakta ve karbonda ortaklanmamış bir elektron kalmaktadır. Triklorometil radikali ([•]CCl₃), oksijen ile reaksiyona girip bir peroksil radikali oluşturur.

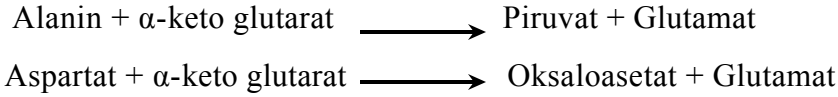


Lipid peroksidasyonu sırasında meydana gelen peroksil radikalleri gibi, CCl₃O₂[•], membran lipidlerindeki çok doymamış yağ asitlerinden hidrojen koparmada çok başarılıdır. Bu da lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. CCl₄ toksisitesinin ana mekanizması, endoplazmik retikulumun lipidlerinde kontrol edilemeyen lipid peroksidasyonunu indüklemektir (4, 5).

Söz konusu maddenin neden olduğu metabolitlerin makromoleküllere kovalent bağlanarak oluşturdukları lipid peroksidasyonu sonucunda, intrahepatik Ca⁺⁺ dengesi bozulur. Böylelikle ana mikrozomal aktivitelerden birisi olan Ca⁺⁺ depolama yeteneği inhibe edilmiş olur (36, 43, 54, 58). CCl₄ karaciğerde özellikle sentrolobüler bölgede neden olduğu nekrozdan sorumludur. Triklorometil radikali, makromoleküllerle

dayanıklı addukt oluşturduğu gibi, oksijenle de birleşerek daha aktif metabolit olan triklorometilperoksi radikali meydana gelir. Bu radikal, lipid peroksidasyonun temel başlatıcısıdır. Lipid peroksidasyon, lipoprotein sentezi için gerekli olan yapıları da hasara uğratarak hepatik lipidozise yardımcı olur. Karaciğerde aşırı lipid birikimi sonucu, organın fonksiyon bozukluğu ve siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkar. Kazlarda oluşturulan deneysel CCl₄ zehirlenmesinde lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeyleri kontrollere göre önemli derecede yüksek bulunmuş ve makroskopik olarak karaciğerde diffüz bir yağlanma şekillendiği görülmüştür (59- 63).

Serum veya plazmadaki bazı enzim aktivitelerindeki değişiklikler, karaciğer hücre hasarının birer göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler arasında amino transferazlar da vardır. Aminotransferazlar (transaminazlar da denilmektedir), alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferazdır. Bu enzim aktivitelerindeki artış, aktif karaciğer hasarını yansıtmaktadır (64, 65). Bu enzimler, transaminasyon reaksiyonlarında görev alan hücre içi enzimlerdir. Aminotransferazlar, bir α -amino asitten α -amino grubunun bir α -keto aside transferini katalizlemektedirler. ALT, alaninin amino grubunun α -keto glutarata transferini katalizlerken; AST, aspartatın amino grubunun α -keto glutarata transferini katalizlemektedir (65).



ALT, ağırlıklı olarak karaciğerde bulunurken, AST birçok dokuda bulunmaktadır. Bu dokular arasında karaciğer, kalp, iskelet kası, böbrek ve beyin sayılabilir. AST, ALT'ye göre karaciğer fonksiyonunun bir göstergesi olarak daha az spesifiktir. Karaciğer hücresinde ALT, sitosolde yoğun olarak bulunurken, AST'nin değişik izoenzimleri mitokondrilerde ve sitosolde bulunmaktadır. Bu enzimler, hemen hemen bütün karaciğer hastalıklarında erken bir yükseliş gösterip hastalık boyunca 2-6 hafta süresince yükselmiş kalmaktadır. Genelde ALT ve AST düzeyleri, birbirine paraleldir. Bu enzimlerin düzeylerindeki düşüşler, karaciğer fonksiyonundaki düzelmeye işaret etmektedir (66, 67). Bu iki önemli enzimin (ALT ve AST) plazma düzeyleri akut ve kronik karaciğer harabiyeti teşhisinde önemli bir faktördür. Her iki enzim de, genellikle böyle durumlarda birbirlerine paralel olarak yüksek aktivite ölçümleri verirler (68, 69).

4.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç veya gelişme basamağında ya da her iki basamakta önleyen veya geciktiren maddelerdir. Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için temel bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging (yaşlanmayı geciktirici) gibi birçok biyolojik fonksiyonlar bu antioksidanlardan kaynaklanmaktadır (70). Genel bir ifade ile lipid peroksidasyon mekanizmasındaki zincirleme reaksiyonların arasına girerek sistemi inhibe eden ve/veya reaktif oksijen radikallerini yok ederek biyolojik yapının devamını sağlayan bileşiklere antioksidanlar denilmektedir (71, 72). Bunlar serbest radikallerin ve metabolitlerinin blokerleri olarak fonksiyon göstermektedirler (73).

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Vitamin C, E, A, β -karoten, metalotionin, poliaminler, melatonin, NADPH, adenzin, koenzim Q-10, ürat, ubikuinol, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metionin, s-adenozil-L-metionin, resveratrol, nitroksidler, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-P_x), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), tioredoksin redüktaz, nitrik oksit sintaz, hem oksijenaz-L ve eozinofil peroksidaz bu gruba girer (74- 76). Diyetle alınan α -tokoferol lipid peroksidasyona karşı korur ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir (77). İnsanlarda serebrovasküler hastalıklarda kullanım alanı bulan idebenonun, serbest radikal yok edicisi gibi etki gösterdiği ve lipid peroksidasyona karşı mitokondrial membranı koruduğu belirlenmiştir (78). Yine anestezi dozlarında kullanılan propofolun, hücre membranlarında lipid peroksidasyonu sınırlandırabildiği veya durdurabildiği gösterilmiştir (79). Bir maddenin etkili bir antioksidan olabilmesi için, lipid peroksil radikali gibi başlangıç formundaki serbest radikallerle uygun oranlarda reaksiyon verebilmesi ve kendi rejenerasyonları için suda eriyen bileşiklerle etkileşime girebilmesi gerekmektedir (36).

Antioksidanlar farklı çözücü sistemlerinde farklı aktiviteler sergilemektedir.

- ✓ Antioksidanlar sistemin özelliğine bağlı olarak farklı aktivite gösterirler. Polar antioksidanlar bulk yağ sistemlerde, apolar antioksidanlar ise yağ-su emülsiyon sistemlerinde daha iyi antioksidatif etki gösterdiği gözlenmiştir (80, 81).

- ✓ Antioksidanların yükü de antioksidan aktiviteyi etkiler. Fizyolojik pH'da negatif yüklü olan askorbik asidin antioksidan aktivitesi, pozitif yüklü lipid misellerinin varlığında daha da artmaktadır (82).

Antioksidan aktiviteye sahip moleküllerin aşağıda anlatıldığı gibi lipid peroksidasyonunu kontrol eden üç temel mekanizmaları vardır (18).

❖ Serbest Radikal Zincir Reaksiyonunu Durdurma Mekanizması

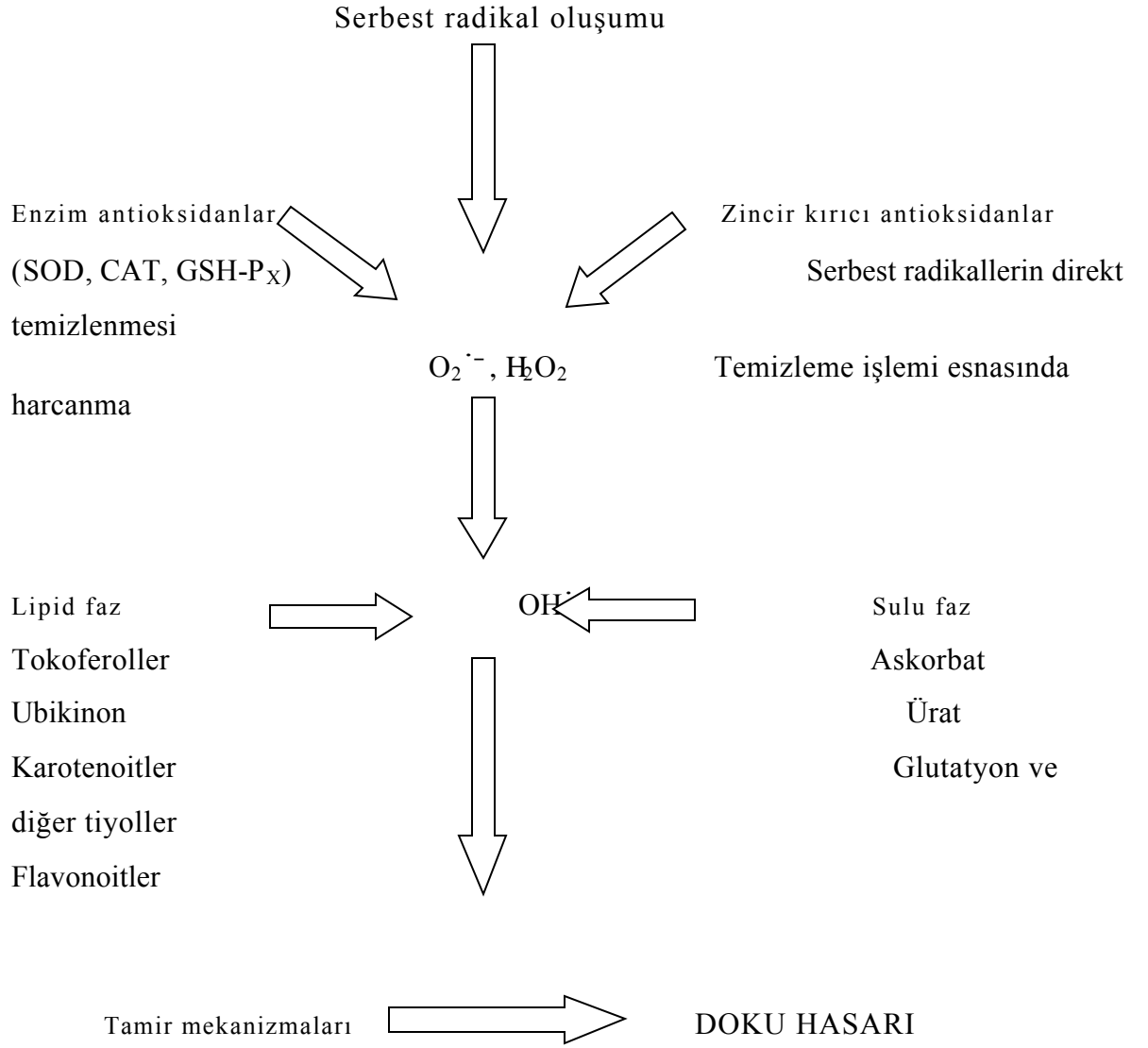
Serbest radikal zincir reaksiyonlarını elektron alarak veya elektron vererek durdurmak mümkündür. Elektron alınarak daha kararlı bir yapı kazanılarak radikalik zincir reaksiyonu durdurulabilir. Ayrıca radikalın elektron alarak daha kararlı bir yapı kazanması da mümkündür. Bazı fenolik bileşikler lipidler üzerinde antioksidan aktivite göstermesine rağmen, in vitro şartlarda DNA, protein ve karbonhidratların oksidatif hasarını hızlandırırlar (83).

❖ Metal Şelatlama Mekanizması

Bu mekanizma, radikal türlerle etkileşme olmadığından dolayı daha çok koruyucu mekanizma olarak bilinir. Bu mekanizmada antioksidanların metal iyonları ile antioksidan kompleksler oluşturmasından ziyade, metal iyonlarının hidroperoksitleri parçalama ve serbest radikal oluşturma karakterleri inhibe edilir (84).

❖ Singlet Oksijen Kuençeri

Antioksidanların üçüncü etkin antioksidan mekanizmaları ise singlet oksijen kuençeri (söndürücüsü) olarak hareket etmeleridir. Bu proses karotenoidler gibi antioksidan ile singlet oksijen (1O_2) arasındaki enerji transferi ile temel haldeki oksijenin (3O_2) oluşması şeklindedir (85). Antioksidanlar temel haldeki oksijenle etkileşerek stabil ürünler oluştururlar (84).



Şekil 3: Serbest radikal saldırılarına karşı antioksidan savunma sistemleri (6).

4.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar için değişik sınıflandırmalar mevcuttur. Örneğin, De la Torre Boronat ve Tamames (86) antioksidanları; askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar, karoten gibi antioksidanlar ile antiradikal ve primer antioksidanlar olmak üzere üçe ayırmışlar. Diğer bir yaygın sınıflandırmada ise antioksidanlar, primer veya radikalik zincir reaksiyonu parçalayan antioksidanlar ile radikalik zincir reaksiyonları başlatıcılarını indirgeyen antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmıştır (87).

Şekilde görüldüğü gibi bazı kaynaklarda ise antioksidanlar, vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlar olarak ikiye ayrılmıştır.

Tablo 3: Antioksidanların sınıflandırılması (20)

ANTIOKSİDANLAR		
Vücutta Bulunan Antioksidanlar		Besin Kaynaklı Antioksidanlar
Enzimler	Küçük Moleküller	Doğal
Katalaz	Askorbik asit	Tokoferoller
Peroksidaz	Glutasyon	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	Fenoller
Glutasyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar	Flavonlar
Glutasyon redüktaz		Kateşinler

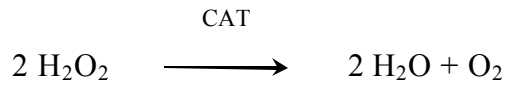
Endojen Antioksidanlar

Enzim Yapısında Olanlar

Antioksidan savunmanın önemli bir bölümünü süperoksit ve H₂O₂ radikallerini temizleyen özel enzimler oluşturur ki; bunlar, süperoksit dismutaz ile birlikte katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glukoz- 6-fosfat dehidrogenaz enzimleri olarak, memeli hücrelerinin intrasellüler savunma sisteminin en temel sınıfını teşkil ederler. Bu enzimlerin aktiviteleri, serbest radikallerin sentez ve yıkılım hızına, beslenme ile alınan selenyum, demir, çinko, bakır ve manganez gibi eser elementlerin mevcudiyetine bağlıdır (88- 91).

Tüm aerobik hücrelerin yapısında bulunan ve yaşamaları için gerekli olan süperoksit dismutaz, organizmada serbest radikallere karşı ilk savunma hattını gerçekleştiren enzimdir (36, 90). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz aracılığında hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H₂O₂, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırır. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler aminotriazol gibi herbisidler de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (76, 92).

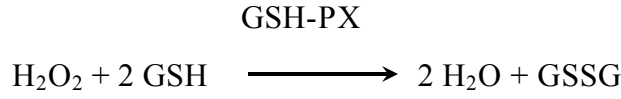
Katalaz, tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan hem içerikli bu enzim, yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonlarında, söz konusu radikali oksijen ve suya çevirir (41).



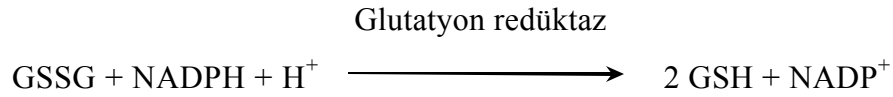
Glutatyon Peroksidaz, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan ve en önemli endojen antioksidanlardan birisi olan glutatyon; glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinin peptit bağları ile birleşmesinden oluşmuş bir tri-peptittir. Oldukça yüksek konsantrasyonda bulunduğu karaciğer tarafından sentezlenir (56). GSH sentezinde karaciğer oldukça aktiftir ve görevli olarak oldukça yüksek konsantrasyonda GSH içermektedir (93). Yapısında bulunan sisteinden dolayı bir sülfidril (-SH) grubu taşımaktadır ve kendisini etkin yapan da bu gruptur (91, 94). Bu nedenle hücre içi bir sülfidril tamponu olarak etkilidir. Selenyuma bağımlı olan GSH-P_x, hem H₂O₂ ve hem de lipid hidroperoksitlerini metabolize ettiği halde, selenyumdan bağımsız olan GSH-P_x ise yalnızca lipid hidroperoksitlerine etkili olabilmektedir (72).

Nükleofilik bir yapıya sahip olan indirgenmiş glutatyon, elektrofilik karakterdeki karbon, çinko, kadmiyum, cıva, kurşun ve bakır gibi atomlarla kompleks oluşturarak ağır metallerin vücuttan atılmalarına yardımcı olur (72). Normal koşullarda, hücrede bulunan H₂O₂'nin detoksifikasyonundan esas olarak GSH-P_x sorumludur. GSH-P_x, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte bir enzimdir (42,

72). Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin yıkılımını katalizleyerek membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı koruyan GSH-P_x, bu etkisini glutatyonun yükseltgenmesi ile gerçekleştirmektedir (42, 71).



Katalitik reaksiyon sonucu H₂O ve oksitlenmiş glutatyon disülfid (GSSG) oluşur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekmektedir. Oluşan yükseltgenmiş glutatyon, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında bir tepkimede, glutatyon redüktaz vasıtası ile glutatyonu meydana getirir (72).



Non-enzim Antioksidanlar

Bu sistem lipofilik (yağda erir) ve hidrofilik (suda erir) antioksidanları içerir. Birçok oksidan madde ilk önce hidrofilik fazda salındığı için, bu fazın antioksidanları ilk koruma hattı olarak rol oynarlar. Ancak lipid fazın antioksidanları, özellikle lipid peroksidasyonuna karşı olmak üzere hidrofilik antioksidanlardan daha etkilidirler (95).

1. Sıvı Faz Antioksidanları:

Hücre sitozölü veya kan plazmasında yer alan antioksidanlara örnek olarak askorbik asit (C vitamini), glutatyon, albumin, melatonin, metionin, sistein, ferritin gibi önemli maddeleri sayabiliriz (39, 91, 96). Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C vitamini, hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır. Kalp, karaciğer, beyin ve dalak dokuları yüksek miktarda C vitamini içerirler (72, 97). Askorbat, belirgin bir pro-antioksidan olarak sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini, plazma lipidlerine difüze olmadan önce tutar. Bu şekilde lipid peroksidasyonunun başlamasını engelleyerek, biyomembranları peroksidatif hasardan korur (72, 94, 98). C vitamini fizyolojik ve yüksek konsantrasyonlarda antioksidan etkili olmasına rağmen, düşük

konsantrasyonlarda membran fosfolipid yapısını değiştirerek lipid peroksidasyonunu arttırır. Bu şekilde; C vitamini doza bağımlı olarak koruyucu veya hasara neden olucu bir etki gösterir (72, 94).

Serbest radikalleri ve lipid peroksitlerini indirgemedede anahtar rolü oynayan GSH, biotransformasyon ile oluşan zehirli maddelerin uzaklaştırılmasında da etkilidir. Doğrudan kendisinin veya değişik enzimlerin aracılığı ile metabolitler, safra yolu kanalı veya merkaptürik asit yolu vasıtasıyla vücuttan atılırlar (56, 57, 72, 99). Organizmada sistein deposu olarak görev yapan GSH, aminoasitlerin membran transportunda da işlevsellik göstermektedir (39).

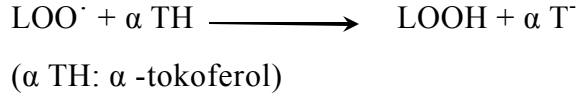
2. Lipid Faz Antioksidanları

Enzimatik olmayan antioksidanların lipid fazda bulunan bileşiklerini A, E ve K vitamini oluşturur (100). Meyvelerin genellikle kabuklarında, sebzelerin çabuk büyüyen kök ve dallarında ve az ergin yeşil yapraklarında fazlasıyla bulunan E vitamini ile yine birçok sebze ve meyvenin yapısında yer alan karotenoidler (A vitamini) insan vücudunda sentez edilemezler. Ancak diyet ile alınabilirler (101, 102). Bu antioksidan maddeler, oksijen etkinliğinin neden olduğu zarara karşı, birbirleri ile ilişkili koruyucu vasıtaların (C vitamini, glutatyon gibi) sinerjistik rol aldığı kompleks bir savunma sistemi oluştururlar (41, 88).

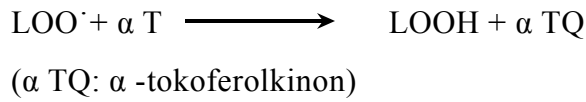
Vitamin E olarak adlandırılan yağda erir bir kısım antioksidanlar tokol ve tokotrienol alt türevleri içeriğinde, biyolojik aktiviteleri farklı türleri barındırırlar. Bunlardan α -tokoferol, dokulardaki E vitamininin % 90 dan fazlasını kapsar ve en fazla biyolojik aktivite gösteren tür olarak bilinir (102, 103). Söz konusu bu vitamin, optimal hücre faaliyetlerini sağlamak için gerekli olan son derece önemli bir antioksidandır. Lipitte çözünürlüğünün fazla olması nedeni ile membran fosfolipidlerine kolayca difüze olabilmekte ve süperoksit, hidroksil ve lipid peroksil radikallerini indirgeyerek, bunların biomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (39, 72, 90, 103).

Lipid peroksidasyonuna karşı savunmanın en yoğun olduğu hücre içi organelleri ve hücre zarlarında yer alan α -tokoferolün antioksidan etkisi, kimyasal yönden en aktif kısmı olan fenolik hidroksil grubundan ileri gelmektedir (39, 71, 73, 104), α -tokoferol insan plazmasındaki yağda çözünen tek ve temel bağı yıkıcı antioksidandır (105). E

vitamininin zincir kırıcı bir özelliğe sahip olmasından dolayı, inhibisyonu, direkt ya da indirekt olarak oksidasyon zincirinin başlangıç basamağında (singlet oksijen, süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali) veya ilerleme basamağında (lipid peroksil radikali) gerçekleşir (39, 72, 102, 106).



Oluşan $\alpha \text{ T}^\cdot$ (tokoferoksil) radikali nispeten stabildir ve lipid peroksidasyonunu kendi kendine başlatmak için yeterince reaktif değildir.



Bu yol ile peroksidasyon reaksiyonlarının radikal zinciri etkili bir şekilde kesilir. Sonraki biyolojik süreç içerisinde askorbat, glutatyon ve Vitamin K gibi diğer antioksidanlarla etkileşim sonucunda detoksifiye oluşumu gerçekleşir (39, 71, 90, 100, 107). Bir diğer yağda çözünür antioksidan olan β -karoten ise provitamin A aktivitesine sahip olarak, çok etkili bir triklorometil peroksil radikali indirgeyicisi ve singlet oksijeni bastırıcısı olarak işlev görmektedir (72, 108).

K vitamini, biyolojik kinon sınıfının en iyi tanınan ve yeşil yapraklı bitkilerde bolca bulunan yağda erir bir bileşimidir (69,107). Mitokondrial solunum zincirinde elektron taşıyıcı olarak da önemli bir göreve sahiptir.

Bitkilerdeki antioksidan etkiden sorumlu temel faktörlerden biri de bitkilerin yapılarında bulunan flavonoidlerdir (109- 112). Doğal kaynaklı antioksidanlar tahıl ve baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde ve bitki kaynaklı içeceklerde bol miktarlarda bulunurlar (113, 114). Bitkisel kaynaklardan elde edilen antioksidanların genellikle tokoferoller, flavonoidler, karotenler, alkaloidler, klorofiller, proteinler, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve fenolik asit gibi fenolik bileşikler yapılarında olduğu görülmüştür (18,115- 118).

4.5. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.)'nun Tarihçesi

Isırgan otunun tedavi amacı ile kullanılmasının önceliği antik çağlara kadar dayanır. Anadolu Dioscorides (M.S. 1.yüzyıl) "Materia Medica" da ısırganın çok sayıda şifalı etkilerini sıralamış, özellikle köpek ısırılmaları, kangren, ülser ve tümör

tedavilerinde yararlı olduğunu belirtmiştir. Eski Yunan ve Roma'da, insanların kendilerini ısırganla döverek romatizma ağrılarından kurtuldukları bildirilmektedir. Aristonun öğrencisi Theophrastus (M.Ö.372-285), "Historia plantarum" da ısırganın bitki olarak özelliklerine değinmiştir (119) ve BORDE "Dietary of Health" kitabında, ısırganın balgamli hastalıklara iyi geldiğini bildirmiştir (120). Isırganın şifalı etkileri Hippokrates'in (M.Ö. 460- 377) eserlerinde bahsedilmektedir (121).

Afrika' da Zulu Kabilesi de bitkiyi afrodisyak olarak kullanmıştır (122). Bitkinin halk hekimliğinde önem kazanması ve yaygınlaşması ise ortaçağda özellikle Batı ve Güney Avrupa' da olmuştur (119). Amerika'da ve Avrupa'da bitkinin yaprak ve kök infüzyonları su içinde kaynatılıp, sıkılarak temin edilen sıvısı tedavi amaçlı kullanılmakta, saç sağlığı ve harici yaralar için hazırlanan preparatların da bileşiminde yer almaktadır (122, 123). Isırgan, halk tıbbındaki önemli yerini günümüze değin korumuştur. Almanya'da ders kitaplarında, tıp alanında kullanımı ayrıntılı olarak verilmiştir (124).

Anadolu kültüründe yıllardan beri geleneksel bir şekilde kullanılmaktadır. Mutfaklarda salata ve yemek olarak kullanıldığı gibi, halk arasında değişik şekillerde tedavi amaçlı olarak da kullanılır. Kansızlık, şeker hastalığı, romatizma, kellik ve kanser gibi bazı hastalıkların tedavisinde pozitif etkiye sahip olduğuna inanılır. Ayrıca yapısında bulunan asetil kolin ve histaminden dolayı yakıcı etkiye de sahiptir (126).

Ancak, bunların çoğunluğu gözleme bağlı olup, etkinlik yolları bilimsel deneylerle gösterilip, açıklanmamıştır.

4.6. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.)'nun Taksonomik ve Morfolojik Özellikleri

Doğa'da ve ülkemizde yaygın olarak bulunan *Urtica dioica* L. iki yüzü tüylü yeşil yapraklı bir bitkidir (127). Bitkiler dünyasında en fazla evrimleşmiş Spermatophyta (tohumlu bitkiler) bölümündedir (128). *Urtica dioica* L., çiçek örtü yaprakları gelişmemiş olduğundan, Apetalae grubundan, çiçek yapısı çok basit, çiçek örtü yapraklarının önünde erkek ve dişi organlar bulunan Urticales takımının Urticaceae (Isırgangiller) familyasındandır.

Urticaceae, tropik ve subtropik bölgelerde yaşayan, süt boruları bulunmayan monoik (aynı bitki üzerinde bazı çiçekler dişi organlara, bazıları da erkek organlara

sahiptir) ve dioik (bir bitkinin çiçeklerinin tümü dişidir veya tümü erkektir) bitkileri kapsar. Bu familyada 40'in üstünde cins ve 500'ün üstünde tür vardır (121).

Toprak üstü kısımlarına Herba Urticae, toprak altı kısımlarına Radix Urticae denir. Tüyleri hayvanlara karşı tipik bir savunma aracıdır (129). Kısa ve dal şeklindeki rizomları odunlaşmıştır. Karşılıklı yerleştirilmiş geniş ve oval yaprakların kenarları testere biçimindedir. Yeşil ve göze batmayan erkek ve dişi çiçekler dik saplar üzerinde düzenlenmişlerdir. Erkek çiçek sapları, tohumlarını döktükten sonra dahi yukarı doğru dik kalırlar; buna karşın, dişi saplar döllenmeden sonra aşağıya sarkarlar. Erkek çiçekler 4 tane petaldan oluşmuştur. Dişi çiçekler, yüksekçe duran tohum yaprağının içinde, fırça biçiminde çıkıntısı olan tohum kesesi içerirler. Döllenmeden sonra tohum kesesinden kabuklu meyve çıkar (121).

Urtica cinsinin türleri, *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., *Urtica cannabina* L., *Urtica pilulifera* L., *Urtica membranacea* Poir. ve *Urtica kiovensis* Rogoff.'dur.



Resim 1: *Urtica dioica* L.

<http://wisplants.uwsp.edu/scripts/Detail.asp?scode=URTDIOsGRA>



Resim 2: *Urtica urens* L.

<http://wisplants.uwsp.edu/scripts/detail.asp?SpCode=URTURE>



Resim 3: *Urtica pilulifera* L.

<http://www.biolib.cz/cz/taxonindex/chU/?taxonid=14871>



Resim 4: *Urtica cannabina* L.

http://www.suiri.tsukuba.ac.jp/~raise/new/plant_album/p5.htm



Resim 5: *Urtica membranacea* Poir.

<http://sophy.u-3mrs.fr/photohtm/YI3344.HTM>

Urtica dioica L. (Büyük ısırgan otu): *Urtica dioica* L., boyu 30 ile 150 cm arasında değişen iki evcikli bir bitkidir (121). Çok yıllık dioik ve otsu bir bitkidir. Yaprakları koyu yeşil renkli, saplı, dişli kenarlı, yakıcı tüylü ve yaygın bir türdür. Bu türün yaprakları Anadolu'da değişik yörelerde pazarlarda satılmakta ve sebze olarak kullanılmaktadır (126). Tuzlacı ve Erol'un yaptığı incelemede; Anadolu'da halk arasında yaygın bir şekilde kullanılan *Urtica dioica*'nın daha ziyade kanser, romatizma, ekzama, siyatik romatizmalarda ve idrar yolları hastalıklarına karşı suda kaynatılarak dekoksasyon halinde kullanıldığı ve "dalağan, dalağaz otu" olarak adlandırıldığı da kaydedilmiştir (130).

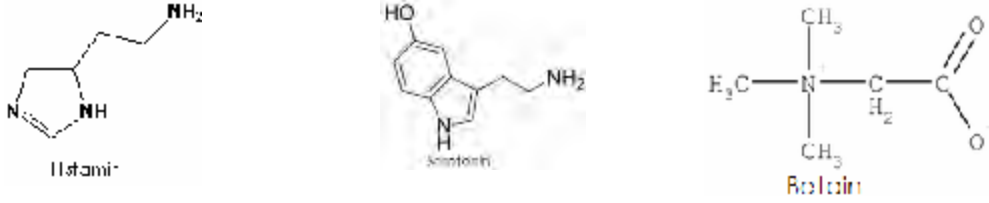
Urtica urens L. (Küçük ısırgan otu): Bir yıllık monoik ve otsu bir bitkidir. Boyu 60 cm kadar olabilir. Yaprakları açık yeşil renkli, saplı, dişli kenarlı, yakıcı ve tüylüdür. Duvar kenarlarında ve harabelerde bol miktarda bulunur. Yaprakları 2-4 cm uzunlukta, oval veya kalp biçimindedir.

Urtica pilulifera L.: Bu tür 30-100 cm yükseklikte bir yıllık ve otsu bir bitkidir. Yaprakları dişli, kenarlı ve saplıdır. Yaygın olarak bulunan ısırgan tohumları bu türün olgun meyveleridir. Dişi çiçekler 1-1,5 cm çapında küresel şekilli ve uzun saplı durumlar meydana getirir. Türkiye'de oldukça yaygın bir bitkidir. Yol ve duvar kenarlarında ve bahçelerde yetişir. Meyveler 3mm kadar uzunluktadır. Yumurta biçiminde parlak esmer renkli ve keten tohumuna benzer taneler halindedir. Suya konulduğunda üzerinde müsilaj tabakası oluşur (131).

4.7. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.)'nun Kimyasal Özellikleri

Urtica dioica L. enzimlerce de zengindir. Kolin asetiltransferaz (132- 134) ve azot metabolizması enzimlerinden transferazların (135, 136) aktivitelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Yapraklarında aminoasit türevlerinden histamin, serotonin, kolin, asetilkolin ve betain tanımlanmıştır (137- 139). *Urtica* ekstrelerinden saflaştırılan betain adlı maddenin, deney hayvanlarında kan koagülasyonunu hızlandırdığı saptanmıştır (122).



Şekil 5: Histamin, Serotonin, Betain

Bitkinin mevsimsel azot dinamiği de 1 yıl boyunca incelenmiştir. (140). Yaz ve sonbahar mevsimlerinde, toprak altı kısımlarının çoğunluğunu serbest aminoasitlerden kaynaklanan bir azot deposu oluşturmaktadır. Tohumlarda ise, ana azot depolarını proteinler oluşturmaktadır. İlkbaharın başlarında, toprak altı azot deposu hareketlenerek yukarılara çıkmakta ve sürgünlerin hızlı gelişmesi için protein yapımında kullanılmaktadır.

Yapraklar, başta demir ve manganez olmak üzere minerallerce de çok zengindir (141,142). Tohumlarından %23.48 oranında yağ elde edilmiş ve yağ asitleri kompozisyonu saptanmıştır (143). Yağ asitleri profilinde ortaya çıkan en ilgi çekici nokta, diğer bitki tohumlarına göre linoleik (%81.46) ve behenik (%1.25) asit içeriklerinin çok yüksek olmasıdır.

Urtica dioica'nın yapraklarında formik asit (144) ve bol miktarda klorofil vardır (145). Isırganın güneşte ve gölgede yetişen yapraklarının klorofil ve karotenoit içerikleri farklı olmaktadır (146). Güneşte yetişen yaprakların klorofil, karoten, violaksantin ve zeaksantin içerikleri gölgede yetişenlerinkine göre daha az bulunmuştur. (147), taze yapraklardan elde ettikleri karotenoitleri, β -karoten, hidroksi- α -karoten, uteoksantin, lutein epoksit ve violaksantin olarak tanımlamışlardır. Bitkinin anaerobik koşullarda fermentasyonundan metan gazı elde edildiği de bildirilmiştir (148).

Bir grup araştırmacı, bitki rizomlarından UDA (*Urtica dioica* Agglutinin) adı verilen bir lektin elde etmişlerdir (149). UDA, 77 değişik amino asitten oluşmuştur ve kompleks bir yapıya sahiptir ve bir çok glikoproteini bağlama kabiliyetindedir (149-151). Lektinler, protein yapısında bileşiklerdir. Plazma membranında karbonhidratların özel kısımlarını bağlayarak hücreye giriş ve çıkışı kontrol ederler ve hasara uğramış molekülleri tanıyarak devre dışı bırakırlar. UDA lektininin insan lenfositlerinin çoğalmasında uyarıcı rolünün bulunduğu, bağışıklık sistemini uyararak hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (152). İn vitro test edilen 9 mikroorganizma suşunun hepsinde inhibisyon etkisini göstermiş ve daha sonraki test denemelerinde de ekstre bileşiğinde bulunan antimikrobiyal komponentlerin varlığından dolayı küflerin teşekkül etmediği gözlemlenmiştir (153).

Tablo 4: Isırgan otunun, tohum, yaprak ve çiçeklerinin vitamin düzeyleri (119)

Urtica dioica L.	Vit.C mg/100 gr	β -Karoten ug /100 gr	α -Tokoferol mg/100 gr	Tiamin mg/100 gr	Riboflavin mg/100 gr	Niasin mg/100	Vit.. B6 mg/100 gr
Tohum	5.7	650	20.2	0.128	0.22	1.79	0.148
Çiçek (kuru)	0	1900	16.9	0.027	0.76	1.86	0.102
Yaprak	237.5	5000	14.4	0.015	0.23	0.62	0.068

Tablo 5: Tohum, çiçek ve yaprakların mineral düzeyleri (mg/100gr) (119)

Urtica Dioica L.	Demir	Çinko	Bakır	Kalsiyum	Fosfor	Magnezyum	Mangan	Sodyum	Potasyum	Selenyum
TOHUM	33	4.30	0.90	2172	642	352	6	24	661	0.078
ÇİÇEK (kuru)	43	2.60	1.20	2978	400	325	19	24	1492	0.0015
Taze Yaprak	13	0.95	0.52	853	75	96	3	16	532	0.0027
Kuru Yaprak	56	4,11	2,25	3693	325	416	13	69	2303	0,012

Urtica dioica L. köklerinden elde edilen ve kitin bağlama özelliği gösteren be-
lektinin antifungal aktivitesi araştırılmıştır. *Urtica dioica* L. lektini antifungal olarak
büyümeyi önlerken, antifungal bitki proteini olan kitinazdan daha farklı bir özellik
göstermiştir (154). Ayrıca UDA lektininin, *Callosobruchus maculatus*'a karşı insektisit
etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (122).

Urtica dioica L.'den elde edilen ekstrenin deney hayvanların diüretik etki
gösterdiği ve kan ürik asit değerlerini düşürdüğü görülmüştür (122). Bir başka
araştırmada perfüzyon şeklinde uygulanan *Urtica dioica* L.ekstresinin sıçanların renal
fonksiyon faaliyetinde artış ve bunun yanı sıra kan basıncında azalmaya neden olduğu
görülmüştür. Renal fonksiyon faaliyeti diüretik aktivite olarak değerlendirilmektedir
(155). Deney tavşanlarına oral ve parental olarak tatbik edilen *Urtica dioica* L.
ekstreleri, hipoglisemik etki göstererek, kan şekeri düzeylerinde % 20-30 düşüş
sağlamıştır (122).

4.8. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.)'nun Tibbî Tedavideki Önemi

Ülkemizde geniş bir yelpazede yetişen ve büyük ısırgan, dikenli ısırgan, dirik,
dızlağan, jincari, dicirgen, gijirtken olarak yöresel isimler alan *Urtica dioica* L. ve
Urtica urens L. protein, vitamin ve mineral içeriğiyle besleyici bir özelliğe sahiptir
(122, 156). Tedavi amaçlı genel kullanımı ise kök ve yaprak ekstresi ile herba posasının
haricen tatbiki, infüzyonlarının diyet ile alınması, tohum ve yapraklarının bal ile
karıştırılarak tüketilmesi şeklinde olmaktadır (119, 122, 123).

Urtica dioica L. bitkisinin, bilimsel tedavideki öneminin çağdaş literatürlerde
yerini alması çok yenidir. Isırgan otu ile hazırlanan değişik preparatlar, antitümoral
aktivite üzerindeki çalışmalarda kullanılmıştır.

Bitki yaprakları karıştırılmak suretiyle hazırlanmış olan yem ile aynı bitkinin
tohumlarının suda kaynatılıp otoklavdan geçirilerek elde edilmiş olan ekstresi,
miyeloma tümör hücre oluşturulduğu evrede ve tümör oluşturulduktan sonraki evrede
farelerin üzerinde ayrı ayrı denenmiştir. Karbonil grup taşıyan ve glukoza bağlı bir
alkaloit olduğu işaret edilen tohum ekstresindeki etken madde, tümör oluşumuna karşı
koruyucu, tümörün yayılmasını engelleyici ve tedavi edici olarak yüksek oranda
kemoterapik bir aktivite göstermiştir. Bunun yanısıra yaprak ve tohumlar, fareleri
miyeloma tümör oluşumuna karşı korumuş; tümör oluşturulan bir başka grupta ise,

diyet olarak kullanılan yaprakların kemoterapik özellikten çok immunoterapik etkinliğine dikkat çekilmiştir (119).

Halk hekimliğinde romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılan *Urtica dioica* L.'nin bu özelliği klinik deneylerle de doğrulanmıştır. Posa haline getirilerek hazırlanmış yaprak preparatlarının harici olarak uygulandığı deneylerin yanısıra, in vitro deneylerde de yaprak ekstralarının antiinflamatuvar etkisi rapor edilmiştir ve özellikle romatoid artritte belirginleşen kronik iltihaplanmayı giderici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (157, 158).

Daha çok halk hekimliğinde romatizma, egzama, ülser, mide kanseri, hemaroid, akciğer apsesi, bademcik iltihabı, kanser, prostat rahatsızlıkları, solunum ve idrar yolu hastalıkları, barsak solucanı ve böbrek taşları ile karaciğer, saç, deri rahatsızlıkları ve harici yaraları tedavi amacı ile kullanılmaktadır, ayrıca ekspektoran, kan dindirici, hipoglisemik ve immunostimulan amaçlı da kullanılmaktadır (119, 122, 159).

Benign Prostat Hiperplazisi (BPH), yaşlı erkeklerde en sık görülen neoplastik bir hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak anlaşılammamakla birlikte, östrojenlerin etkisi olduğu bilinmektedir. Aromatazlar, androjenlerin östrojene dönüşümünde anahtar bir enzimdir. Bu enzimin inhibisyonu ile östrojen düzeylerindeki azalma prostat rahatsızlığı olan kişilerde düzelmeye sağlar (156). Bitkinin kök ekstresinde yer alan ve aromataz inhibitörleri olan secoisolarisiresinol, lignan, oleanolik asit ve ursolik asitin, bu hastalığın tedavisindeki rolünü araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, söz konusu aromatazların iyileştirici etkileri bulunmuştur (160). Bununla ilgili bir başka çalışmada, yine bitki kökünün organik solvent ekstresi, prostat hücre metabolizmasında tümör gelişimini ve çoğalma hızını inhibe etmiş, bu inhibisyonun da ekstre içeriği olan steroidal komponentler vasıtası ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (161).

4.9. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.)'nin Antioksidan Özellikleri

Günümüzde, birçok biyolojik hasarın ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir (89, 90). Ancak serbest radikaller, birçok mekanizma yolu ile oluşmasına rağmen, bu bileşikleri inaktif hale getirebilecek doğal savunma kaynakları vardır. Antioksidan denilen bu kaynakların insan vücudunda sentez edilemeyen türlerinin diyetle bulunması gerekmektedir (88, 101). Isırgan otu, diyet ile

vücuda alınması gerekli besin maddeleri içeriğiyle iyi bir antioksidan zenginliğe sahiptir (119, 153). Bu antioksidanların en önemlileri olarak α -tokoferol (E vitamini), askorbat (C vitamini), flavonoidler (kemferol, kuersetin, rutin), karotenoidler (β -karoten, ksantofil, retinoik asit, retinol), K vitamini, kateşinler ve tanenler ile fenolik bileşiklerden kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asit gösterilebilir (72, 119, 162, 163).

Sebze ve meyvelerin, antioksidan özellikleri taşıdıkları, askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler gibi temel bileşik guruplarından kaynaklanmaktadır. Çünkü bu bileşikler meyvelerde ve bitkisel besinlerde bol miktarda bulunmaktadır (109, 110, 164).

Antioksidanların diğer önemli bir doğal kaynağının ise tohumlar olduğu kaydedilmiştir (87). İnsan vücudunun sentezleyemediği önemli antioksidanlardan α -tokoferol, ısırgan otu yapraklarında bulunan miktarı ile, en iyi doğal kaynaklardan sayılmaktadır (119). Primer olarak yeşil yaprakların kloroplastında meydana gelen E vitamininin sekiz formundan birisi olan α -tokoferol, vücutta şilomikronlarla ince barsaktan emilir ve lenf yolu ile dolaşıma katılır. Dolaşımda ise lipoproteinlere bağlı olarak bulunur. Hücredeki E vitamininin pek çoğu mitokondri ve endoplazmik retikulumda toplanmıştır. Bunun yanısıra karaciğer ve iskelet kası gibi pek çok dokuda da E vitamini vardır (90, 101).

E vitamininin en potansiyel formu olan α -tokoferol, lipid peroksidasyonun inaktivite reaksiyonlarının en yoğun olduğu hücre içi organellerinin hücre zarlarında bulunur, α -tokoferolün zarlardan hücre içi organellerine taşınımı ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, " α -tokoferol taşıma proteinleri" nin homojen yapısı ve sitozoldeki vitamene bağlanma aktivitesi araştırılmıştır. Deney sonucunda, yaklaşık 30.000 molekül ağırlığında olduğu tespit edilen " α -tokoferol taşıma proteini" nin, sıçan karaciğerinde yoğun bir arıtma gücüne sahip olduğu tespit edilmiştir (104).

Vücut genlerinde bulunan kalıtsal özellikleri ile, karaciğerlerinde bakır birikmesi ve diğer bazı klinik göstergelerinden dolayı Wilson hastalığına benzer sendromlar gösteren Long-Evans Cinnamon (LEC) sıçanları üzerinde yapılan bir deneyde α -tokoferolün antioksidan etkileri araştırılmıştır. Diyetlerine vitamin karıştırılmış erkek sıçanların tedaviye cevap verdiği ve α -tokoferolün yoğun şekilde absorbe edilerek transportunun gerçekleşmesi sonucunda, antioksidan etkisinin olduğu rapor edilmiştir. (103). Farklı model sistemler üzerindeki toksisite çalışmaları α -tokoferolün etkili bir

antioksidan olduğunu göstermiş; bu da plazma ALT ve AST enzim seviyelerinde tespit edilen düşmeler ile kanıtlanmıştır (54, 165).

Vücutta sentezlenemediği için diyetle bulunması gereken başka bir antioksidan da Vitamin C dir (101, 119). Isırgan otu yapraklarında yüksek miktarda yer alan C vitamini, biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunur. Özellikle kan plazmasındaki askorbik asit, peroksil radikalini tuzağa düşürmede önemlidir (73).

C vitamininin, hem kendisinin bir antioksidan olduğu hem de Vit E ile etkileşmek suretiyle bir ko-antioksidan olarak aktif olduğu belirtilmektedir (73, 106).

Antioksidan sistemde C vitamini ile E vitamini sinerjistik bir etkileşim göstererek, serbest radikallere karşı hızla cevap verirler. Başta karaciğer olmak üzere organlardaki C vitamini miktarı E vitamini miktarından daha fazladır. Ancak; E vitamini C vitamininden daha lipofilik olduğundan, biomembranlarda C vitaminine oranla daha fazla depolanır. E vitamininin antioksidan etkisinin C vitamininkinden fazla olması da bundan dolayıdır (101).

E vitamini ile C vitamininin serbest radikallere karşı ortak savunmasında, ilk kademedede E vitamini aktif iken, ikinci kademedede aktivasyon C vitamini üzerine geçer. Antioksidan etkisinin temeli olarak fenol grubu barındıran tokoferollerin, savunma hattındaki ilk reaksiyonlarının sonunda serbest radikaller, tokoperoksit radikali olarak kendi yapılarında meydana gelir (101, 106). C vitamininin rejenerasyon etkisi, tokoperoksil radikalinin membran yüzeyine geçişinden sonra görülür. Oluşan yeni radikal, membran/su ara yüzeyinde, ya askorbik asitle birlikte tekrar tokoferol haline dönerek antioksidan rolüne devam eder, ya da ortamdaki diğer bir peroksil radikali ile birleşerek reaktif olmayan tokoferol kinon haline dönüşür. Böylece 1 molekül E vitamini, 2 molekül peroksil radikalini temizlemiş olur (101, 106, 166). Yeniden oluşan α -tokoferol ise, membran sisteminin ömrünün uzatılmasında etkin görevde bulunur (167). Diğer taraftan C vitamini de kendi aracılığı ile oluşan bu rejenerasyon reaksiyonunun sonunda, aynen E vitamini gibi bir radikal durumuna düşer (106).

Sebzelerin koyu yeşil yapraklarında bulunan K vitamini, ısırgan otunun bir başka antioksidan içeriğidir ve kinonun iyi bilinen tipik biyolojik bileşiklerindedir (107). İn vitro bir araştırma yağda eriyen vitaminler içerisinde Vitamin K hidrokinonlarının oksidasyon reaksiyonlarında zincir kırıcı rolleri ve serbest radikal temizleme özellikleri ile oldukça aktif antioksidan türlerinden sayılabileceğini göstermektedir (107).

Ön maddesi karotenler olan A vitamini, ısırgan otuna antioksidan özellik veren bir diğer bileşiktir (119). Bunlar α , β , γ karoten, retinol, retinal, retinoik asit, likopen ve değişik molekül yapısındaki ksantinlerdir. Karotenoidler, barsak mukozasında ve ince barsakta pasif difüzyon ile emilirler. Emilim oranları diyetteki yağ miktarına bağlıdır. Karaciğer tarafından absorbe edilerek şilomikron kalıntılarına çevrilen A vitamini, gerektiğinde salıverilmekte ve öncelikle LDL ile dolaşıma geçmektedir (101). A vitamini türevlerinin iyi birer singlet oksijen ve radikal tutucu özelliğe sahip antioksidanlar olarak nitelendirilmelerinin yanısıra karbon tetraklorür metaboliti olan triklor metil peroksil radikalleri ile de hızla reaksiyon vererek, zincir kırıcı yapıda oldukları saptanmıştır (72). Yapılan çalışmalar, β -karotenin doğada bilinen en etkili singlet oksijen bastırıcısı olduğunu (73) ve etkin olarak triklor metil peroksil radikallerini de indirgediğini göstermiştir (72).

Flavonoidler ve diğer polifenoller, insan sağlığı üzerinde antioksidan olarak olumlu kazançları ile son zamanlarda popüler olan bitki bileşikleridir. Antioksidan olarak işlevselliklerinin yanısıra antimikrobiyal ve immunomodulator sistemlere de yarar sağlarlar (168). Isırgan otunun önemli yapılarından olan tanenler de biyolojik aktivitelerinden dolayı geniş ilgi uyandıran flavonoid yapısındaki bitki bileşikleridir. Yüksek oksijen duyarlılığına sahip olarak, flavonoidler gibi metal iyonları için güçlü bağlayıcı özelliklere sahiptirler (168).

Isırgan otunun içeriğinde bulunan ve sıcakkanlı hayvanlarda önemli derecede biyolojik rolü olan selenyum, semimetalik bir elementtir. E vitamini ile birlikte sinerjistik etki göstermekte ve çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu onunla birlikte önlemektedir (90, 119, 165).

Serbest radikallerin hücre hasarlarına karşı antioksidan olarak görev yapan bitki kaynaklı mikrobisleyiciler arasında bakır, çinko ve manganezin de yer aldığı rapor edilmektedir (88, 119).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 6: Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal sarf maddeleri	Marka
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma (ABD)
5,5-Dithio-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	Sigma (ABD)
Etanol	Riedel Haaen
Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA)	Sigma (ABD)
Folin Reaktifi	Sigma (ABD)
Fosfotungstik asit	Merck (Almanya)
Asetik Asit	Merck (Almanya)
Gliserin	Sigma (ABD)
Glutamil sisteinilglisin (Glutatyon)	Sigma (ABD)
HCl	Merck (Almanya)
Karbon tetraklorür	Carlo Erba, (Milano, İtalya)
Metafosforik asit	Carlo Erba, (Milano, İtalya)
NaCl	Merck (Almanya)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Biorad (ABD)
TBA(Tiyobarbiturik asit)	Merck, (Germany)
TEP (Tetra etoksi propan)	Fluka Chem. (Switzerland)
Tris	Merck (Almanya)
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck (Almanya)
Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Merck (Almanya)
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck (Almanya)
Sodyum Potasyum Tartarat ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	Sigma (ABD)

5.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 7: Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz İsmi	Markası ve Modeli
Bidistile su cihazı	Millipore MilliQ/RG (Fransa)
Derin dondurucu	Bosch, -20 °C
Elektrikli su ısıtıcısı	Rommelsbacher
Etüv	Heraeus (Almanya)
Hamilton enjektörler	Hamilton (ABD)
Hassas Terazı	Sartorius (Almanya)
Homojenizator	Janke and Kunkel IKA -WERK RW 14 H
Manyetik Isıtıcılı karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mekanik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mikropipet	Gillson Pippetman (Fransa)
Otoanalizör	Hitachi 717 Boehringer Mannheim (Japonya)
pH metre	Mettler Toledo MP220 (İtalya)
Ultra Santrifuj	Heraeus (Almanya)
Spektrofotometre	Backman UV-2100 S
Vorteks karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)

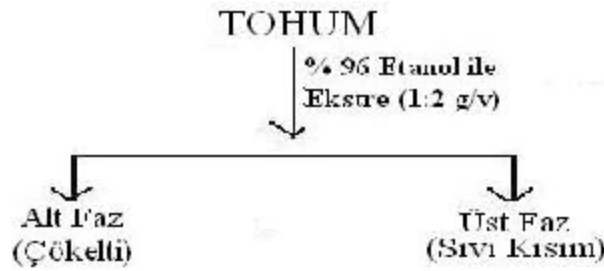
5.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- IN HCl çözeltisi: %37'lik HCl (d:1.19 g/ml) çözeltisinden 8.286 ml HCl alındı. Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- % 0.335'lik TBA çözeltisi: 0.335g TBA distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- % 10' luk fosfotungstik asit çözeltisi : 10g fosfotungstik asit alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- % 50' lik asetik asit çözeltisi: %100'lük asit çözeltisinden 50 ml alındı. Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 0.15M KCl çözeltisi: 0.15 mol KCl alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.Homojenizasyon tamponu için. (Siyah şişede buzdolabında saklandı.)
- % 0.8'lik TBA çözeltisi: 0.4g TBA alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.
- % 0.9'luk NaCl çözeltisi: 2.25g NaCl alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- % 8.1'lik SDS çözeltisi: 8.1g SDS alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- % 20'lik asetik asit çözeltisi: %100'lük asit çözeltisinden 20 ml alındı. Distile su ile 100 ml 'ye tamamlandı.
- Doymus NaOH çözeltisi: Oda sıcaklığında 25 ml distile suda çözünebildiği kadar NaOH çözüldü. (pH ayarı için.)
- % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi: 1g sodyum sitrat distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- Ellman Ayıracı: 4 mg DTNB, 10 ml % 1' lik sodyum sitrat çözeltisi içinde çözülerek, deney günü hazırlandı.
- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67g metafosforik asit, 0.2g EDTA-Na tuzu, 30g NaCl, sırası ile 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.
- 0.3M Na₂HPO₄ çözeltisi: 0.075mol Na₂HPO₄ alındı. Distile suda çözülerek, hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
- GSH Standardı: 1 mg/ml distile su ile deney günü hazırlandı. GSH Çalışma

Standartları; GSH standartından %2 , % 5 , % 7.5 ve % 10' luk konsantrasyonlarda distile su ile hazırlandı.

- Plazmada Lipid peroksit Stok Standart Çözeltisi: 0.1 mmol/100 ml TEP (1,1,3,3, tetra etoksi propan) Çalışma Standartları: Stok standart çözeltisinden 4, 6, 8 ve 10 nmol/ml olacak şekilde hazırlandı.
- A çözeltisi: 2g Na₂CO₃ tartılıp NaOH (0.1N için: 0.4g alınıp100ml'ye tamamlandı) çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı.
- B çözeltisi: 1g CuSO₄.5H₂O distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı. 2 g Sodyum potasyum tartarat çözeltisi distile suda çözülerek, hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu iki çözelti eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanıldı. Karışım taze hazırlandı.

5.1.4. Kullanılacak Ekstrenin Hazırlanması



Şekil 6: Ekstrenin Hazırlanması

Isırgan otu tohumu Afyon yöresinden toplanmış, M.Ü. Fen-Fakültesi öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Şener Akıncı tarafından tanımlanması yapılmıştır.

1 kg ısırgan tohumu toz edildikten sonra 2 litre etil alkolle 15 dakika ayırma hunisinde karıştırılarak ekstrakte edildi. 24 saat beklemeye bırakıldı. Süpernatant (üstteki sıvı kısım) alındı. Çökelti kısmı atıldı. Etil alkole geçen aktif madde kısmı Evaporatörde etil alkol uçurularak elde edildi. Elde edilen ekstrede protein tayini yapıldı. Ekstrenin protein miktarı 600±70 µg/ml olarak belirlendi.

Koyu yeşil renkli ekstre sıçanlara 14 gün süresince her gün 1g/kg ekstre intra peritoneal (i.p.) olarak enjekte edildi.

5.1.5. Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Beslenmeleri

Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarından temin edilen her biri 200- 220g ağırlığında erişkin 28 adet Wistar Albino türü dişi sıçan kullanıldı. Çalışma başvurusu Etik Komite tarafından 14.04.2006- 62. 2005. mar sayı ile onay aldı. Deney başlangıcında sıçanlar önce iki ana gruba ayrıldı. 14'er sıçandan oluşan kontrol ve deney grubu, deney süresince, % 24 ham protein, % 0.88 kalsiyum, ortalama % 0.44 fosfor, % 3.7 ham selüloz, % 5.7 ham kül, % 0.2 tuz, % 10 nem içeriğine sahip 2600 kg/cal metabolik enerjili, 16mm çapında pellet tipi bazal yem ile beslendiler. Su ihtiyaçları, musluk suyu ile günlük olarak karşılandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Hayvan Çalışmaları

Çalışmamızda 200- 220 g ağırlığında 28 adet Wistar Albino türü dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar kontrol ve deney grubu olarak, her birisinde 14 sıçan olacak şekilde iki grup altında toplandı.

- Kontrol grubu (1.grup)
- Kontrol + karbon tetraklorür grubu (2.grup)
- Isırgan otu tohumu ekstresi (3.grup)
- Isırgan otu tohumu ekstresi + karbon tetraklorür grubu (4.grup)

Hazırlanan ekstre 3. ve 4. grup sıçanlara 14 gün süresince her gün 1g/kg (i.p.) enjekte edildi. Beslenme sürelerinin bitiminde, 16- 18 saat süre ile aç bırakıldıktan sonra, ertesi sabah 2. ve 4. grup sıçanlara tek doz (1ml/kg) karbon tetraklorürün zeytinyağındaki % 20' lik çözeltisi, 1. ve 3.grup sıçanlara ise aynı hacimde zeytinyağı i.p. olarak 15. gün uygulandı. Uygulamadan iki saat sonra, ketamin ile anesteziye alınan sıçanların kalplerinden alınan kanlar heparinlenmiş tüplere konuldu; eter verilerek öldürülen sıçanların karaciğerleri hızla çıkartıldı, temizlendi ve % 0.9' luk soğuk NaCl çözeltisi ile yıkandı. Filtre kağıdı ile kurutularak, kullanıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı. Karaciğerin bir kısmı histolojik çalışmalar için %10 formaldehit solüsyonu içerisinde saklandı. Alınan kanlar santrifüj edildi, plazmaları ayrıldı, bekletilmeksizin ALT ve AST enzim aktiviteleri ile glukoz, kolesterol, üre azotu (BUN), ürik asit, trigliserid, kalsiyum, total protein, fosfor, albumin, magnezyum, değerleri ölçüldü. Plazma lipid peroksit ölçümü ertesi gün yapıldı.

5.2.2. Karaciğerde Yapılan İncelemeler

Karbontetraklorür (1 ml/kg, i.p.) uygulamasından iki saat sonra öldürülen sıçanların hızla çıkarılan karaciğerleri % 0.9'luk soğuk NaCl çözeltisi (serum fizyolojik) ile yıkandı, filitre kağıdı ile kurulandı ve derin dondurucuda (-20°C) deney gününe kadar saklandı.

5.2.3. Karaciğer Lipid Peroksit Düzeyinin Ölçülmesi (169)

TBA testi, lipid peroksidasyonun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın, TBA ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin, 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır.

Deneyin Yapılışı: Derin dondurucuda (-20 °C) saklanan karaciğerden 1g kadar tartılarak 9 ml 0.15M soğuk KCl ilavesi ile doku homojenizatoründe homojenize edildi. Böylelikle % 10'luk karaciğer homojenatı elde edildi. Buradan 0.2 ml alındı, üzerine 0.2 ml % 8.1'lik SDS, 1.5 ml % 20'lik asetik asit (pH: 3.5), 1.5 ml % 0.8'lik TBA ilave edilerek vortekste kuvvetlice karıştırıldı. Karışım kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüpler soğutularak 3500 rpm' de 15 dk. santrifuj edildi. Süpernatant alınarak deney körüne karşı spektrofotometrede okundu. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksi propan kullanıldı ve sonuçlar nmol MDA/g karaciğer olarak, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

5.2.4. Karaciğer Glutatyon Düzeyinin Ölçülmesi (170)

GSH Standardı: 1 mg/ml distile su ile deney günü hazırlandı.

GSH Çalışma Standartları; GSH standartından %2, %5, %7.5 ve %10'luk konsantrasyonlarda distile su ile hazırlandı.

Metod, sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu renkli ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi amacına dayanır. Ellman metoduna göre, DTNB (5,5-ditiyo bis-2 nitro benzoik asit), sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenerek, 1 mol (-SH) başına 1 mol TNB (2-nitro, 5-tio benzoik asit) oluşur. Oluşan sarı renkli ürün spektrofotometrede 412 nm de absorbans verir (TNB absorbansı, GSH miktarı ile doğru orantılıdır).



Deneyin Yapılışı: 0.15M soğuk KCl çözeltisi ile hazırlanan % 10'luk karaciğer homojenatından 0.5 ml alındı. Üzerine 1.5 ml 0.15M KCl çözeltisi ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve santrifuj edildi.

Sonra 0.5 ml süpernatant alındı. Üzerine 2 ml 0.3M Na₂HPO₄ ve 0.5 ml Ellman ayırıcı ilave edildi. Ellman muamelesinden sonra oluşan renk 1 dakika içerisinde 412 nm de spektrofotometrede okundu.

Ölçüm, standart grafik eğrisi kullanılarak ve seyreltme faktörü göz önüne alınarak yapıldı ve sonuç μmol Glutatyon/g karaciğer olarak bulundu.

5.2.5. Plazmada Yapılan İncelemeler

Karbon tetraklorür (1 ml/kg, i.p.) uygulamasından iki saat sonra öldürülen 1., 2. ve 4. grup sıçanların plazma ALT ve AST enzim aktiviteleri ile plazma lipid peroksit değerleri ölçüldü. İsrırgan otu tohumu ekstresi uygulanan 3. grup sıçanlarda da kontrol grubu ile birlikte diğer biyokimyasal parametreler otoanalizör (Hitachi 717 Boehringer Mannheim) ile ölçüldü.

5.2.6. Plazmada Lipid Peroksit Düzeyinin Ölçülmesi (171)

Metodun prensibi, karaciğer MDA düzeyi tespit metodundaki amaca dayanır.
Stok Standart Çözeltisi: 0.1 mmol/100 ml TEP (1,1,3,3, tetra etoksi propan)
Çalışma Standartları: Stok standart çözeltisinden 4, 6, 8 ve 10 nmol/ml olacak şekilde distile su ile seyreltilerek, deney gününde hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Heparinli kan örnekleri santrifüj edilerek, plazmaları ayrıldı.
Alınan plazmadan 0.3 ml alınarak üzerine 2.4 ml N/12 H₂SO₄ ve 0.3 ml %10' luk fosfotungstik asit kondu. Vortekste kuvvetlice karıştırılarak, 3000 rpm' de 15 dk santrifüj edildi ve proteinler çöktürüldü. Süpernatant atıldı. Kalan (çökelek üzerine 4 ml distile su eklenerek, bir baget yardımı ile süspansiyon haline getirildi. Üzerine 1 ml % 0.335' lik TBA ilave edildi; vortekste iyice karıştırıldı ve 60 dk. süre ile kaynar su banyosunda tutuldu. Daha sonra soğutulan tüpler 3000 rpm' de 10 dk. santrifuj edildi. Süpernatantların absorbansları, deney körüne karşı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okundu. Değerlendirme, standart grafiği kullanılarak nmol MDA/ml plazma olarak yapıldı.

5.2.7. Plazma ALT ve AST Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi

Plazmadaki ALT ve AST enzim aktiviteleri ile glukoz, kolesterol, ürik asit, BUN, glukoz, albumin, total protein, trigliserid, kolesterol, VLDL magnezyum, kalsiyum, fosfor değerleri otoanalizörde ölçüldü.

5.2.8. Histolojik Çalışmalar

Işık mikroskopik preparasyon:

Tüm gruplardan alınan karaciğer ve böbrek doku örnekleri % 10'luk nötral formalin solüsyonu ile 18 saat fikse edildi. Yükselen alkol serilerinden (%70, % 90, %96, %100) geçirilerek suyu alındı, toluen ile şeffaflaştırıldı, 60 C'lik etüvdeki parafinde 1 gece bekletildikten sonra bloklandı. Bu bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak, genel morfolojik değerlendirme yapabilmek için hematoksilen-eosin (H-E) boyası yapıldı. Boyalı kesitler Olympus BH2 fotomikroskop ile incelenerek fotoğraflandı.

5.2.9. Lowry Metodu ile Protein Tayini (172)

Bu metod ile proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona girerek folin reaktifi ile indirgenir. Bu sırada oluşan mavi rengin şiddeti ile protein konsantrasyonu arasında bir orantı vardır.

A çözeltisi: %2'lik Sodyum karbonat çözeltisi (0.1 N Sodyum hidroksit çözeltisinde hazırlandı).

B çözeltisi: % 1'lik Bakır sülfat çözeltisi ile %2'lik Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanıldı. Karışım taze hazırlandı.

C çözeltisi: 50 mL A çözeltisi ve 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlandı (taze hazırlandı).

Folin Reaktifi: Folin reaktifi kullanılmadan önce 1/1 oranda distile su ile karıştırıldı.

Protein Stok Standart Çözeltisi: %100'lük (1mg/ml) BSA (bovin serum albumin) serum fizyolojik içinde hazırlandı.

Çalışma Standart Çözeltisi: Stok standart çözeltisi %5, %10 ve %15 albumin içerecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlandı.

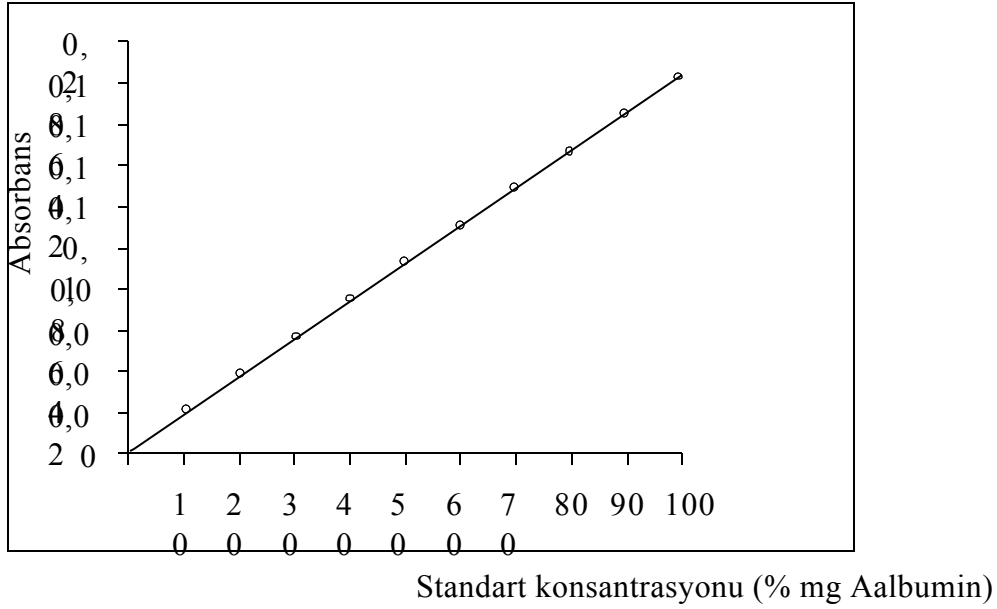
1. Numune, standart ve kör tüplerine 3 mL C çözeltisi eklendi ve vorteksle karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.

2. Her bir tüpe 0.1 ml folin hızla eklenip vorteks ile karıştırıldı.

3. Oda ısısında 30 dakika bekletildi.

4. 500 nm'de köre karşı spektrofotometrede absorbanslar okundu. Çalışma standartlarının konsantrasyonları ve onlara karşılık gelen absorbans değerleri arasında

bir grafik çizilerek standart eğrisi elde edildi. Protein değerleri aşağıdaki standart protein grafiğinden hesaplandı.



Grafik 1 : Bovin serum albumin standart grafiği

5.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Grumlardan elde edilen dataların analizi SPSS paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA, Tukey) ile incelendi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Plazmada Yapılan Biyokimyasal İncelemelerde Elde Edilen Bulgular

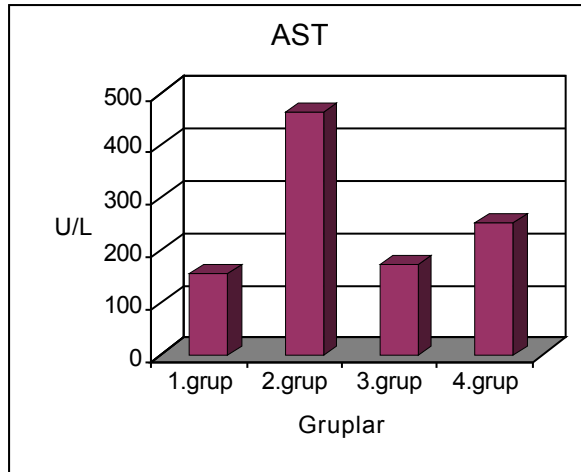
Tablo 8: Grupların plazma AST ve ALT değerleri

GRUPLAR	AST(U/L)	ALT (U/L)
Kontrol grubu (1.grup)	155.71±55.66	54.57±8.52
CCl ₄ grubu (2.grup)	462.28±229.35*	92.42±24.54**
Ekstre grubu (3.grup)	172.28±16.78 ^b	27.14±10.57 ^{**a}
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	251.42±54.36 ^b	26.71±12.82 ^{**a}

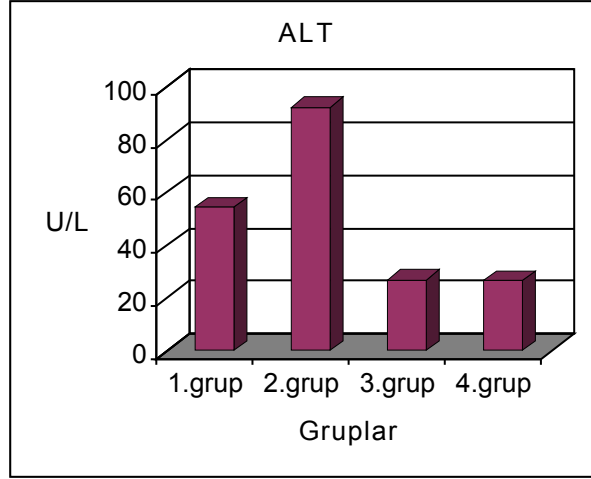
Kontrol grubuna göre kıyaslama, * p<0.001, **p<0.05

CCl₄ grubuna göre kıyaslama, ^a p<0.001, ^bp<0.05

Kontrol + CCl₄ (grup 2) sıçanlarının plazma AST ve ALT değerleri grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Isırgan otu tohumu ekstresi uygulanan sıçanların (grup 3) her iki gurubunda da AST değerleri kontrol grubu değerlerine yakındır. Buna karşın ekstre uygulanan sıçanların plazma ALT düzeyleri kontrol grubundan daha düşük gözlenmiştir. Kontrol + CCl₄ grubuna göre ekstre uygulanan gruplar kıyaslandığında grup 3 ve grup 4'ün plazma ALT ve AST değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 8).



Grafik 2: Grupların plazma AST değerleri



Grafik 3: Grupların plazma ALT değerleri

Tablo 9: Grupların plazma ürik asit ve BUN değerleri

GRUPLAR	ÜRİKASİT(mg/dl)	BUN(mg/dl)
Kontrol grubu (1.grup)	0.95±0.22	15.00±2.64
CCl ₄ grubu (2.grup)	1.35±0.58	20.71±5.55
Ekstre grubu (3.grup)	1.48±0.49	24.14±25.97
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	1.50±0.42	32.28±18.12

Gruplardaki deney hayvanlarının plazmalarında ürik asit ve BUN değerleri arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir (Tablo 9).

Tablo 10: Grupların plazma glukoz, albumin, total protein değerleri

GRUPLAR	GLUKOZ(mg/dl)	ALBUMİN(g/dl)	TOTAL PROTEİN(g/dl)
Kontrol grubu (1.grup)	133.14±14.57	3.74±0.66	7.54±0.61
CCl ₄ grubu (2.grup)	117.28±20.78	3.11±0.45	6.24±0.75**
Ekstre grubu (3.grup)	114.00±17.67	3.02±0.25**	6.24±0.36**
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	126.28±25.44	3.05±0.21**	5.97±0.33*

Kontrol grubuna göre kıyaslama, * p<0.001, **p<0.05

Grupların glukoz, albumin ve total protein değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre kontrol + CCl₄ grubu sıçanlarının plazma albumin ve total protein düzeylerinde azalmalar gözlenmiştir. Tek başına ekstre uygulanan sıçanların plazma

glukoz düzeyleri %14 oranında azalırken ekstre + CCl₄ uygulanması plazma glukoz düzeylerinde değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 10).

Tablo 11: Grupların plazma trigliserid, kolesterol, VLDL değerleri

GRUPLAR	TRİGLİSERİD (mg/dl)	KOLESTEROL (mg/dl)	VLDL(mg/dl)
Kontrol grubu(1.grup)	42.57±16.74	47.14±9.83	10.85±6.14
CCl ₄ grubu (2.grup)	54.42±23.22	43.42±7.23	12.42±6.80
Ekstre grubu (3.grup)	130.71±29.25 ^{*.a}	43.00±4.04	24.42±8.01 ^{**b}
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	97.00±28.97 ^{*.b}	46.85±12.04	22.28±7.08 ^{**}

Kontrol grubuna göre kıyaslama, * p<0.001 , **p<0.05

CCl₄ grubuna göre kıyaslama, ^a p<0.001, ^b p<0.05

Grup 3 ve grup 4'ün Trigliserid, VLDL değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar gözlenmiştir. Kontrol + CCl₄ grubuna göre, ekstre +CCl₄ uygulanan grubun plazma trigliserid, VLDL ve kolesterol düzeyleri kıyaslandığında plazma trigliserid ve plazma VLDL değerlerinde anlamlı artışlar olduğu gözlenirken, plazma kolesterol düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 11).

Tablo 12: Grupların plazma magnezyum, kalsiyum, fosfor değerleri

GRUPLAR	MAGNEZYUM (mg/dl)	KALSİYUM (mg/dl)	FOSFOR (mg/dl)
Kontrol grubu (1.grup)	2.00±0.77	10.12±0.57	4.81±0.41
CCl ₄ grubu (2.grup)	2.06±0.17	9.25±0.48	4.54±1.05
Ekstre grubu (3.grup)	2.26±0.54	9.31±0.40	5.22±1.50
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	3.37±1.51 ^{**b}	10.60±1.07 ^b	7.82±2.92 ^{**b}

Kontrol grubuna göre kıyaslama, **p<0.05

CCl₄ grubuna göre kıyaslama, ^b p<0.05

Grup 4'ün plazma magnezyum, fosfor değerleri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ayrıca CCl₄ grubuna göre grup 4'ün magnezyum, kalsiyum ve fosfor değerlerinde de artışlar görülmüştür. (Tablo 12)

6.2. Karaciğer Lipid Peroksidasyon ve GSH Düzeyleri ile İlgili Elde Edilen Bulgular

Tablo 13: Grupların karaciğer glutatyon, karaciğer MDA ve plazma MDA değerleri

GRUPLAR	MDA (nmol/ gdoku)	PLAZMA MDA (nmol/ml)	GLUTATYON (µmol/ gdoku)
Kontrol grubu (1.grup)	336.15±55.57	4.32±0.76	6.51±0.66
CCl ₄ grubu (2.grup)	414.22±17.71 ^{**}	7.52±1.14 [*]	3.50±0.91 [*]
Ekstre grubu (3.grup)	269.50±27.11 ^{**a}	4.6±1.12 ^a	7.9±0.98 ^a
Ekstre + CCl ₄ (4.grup)	361.87±24.98 ^a	6.3±0.73 ^{**}	3.9±0.70 [*]

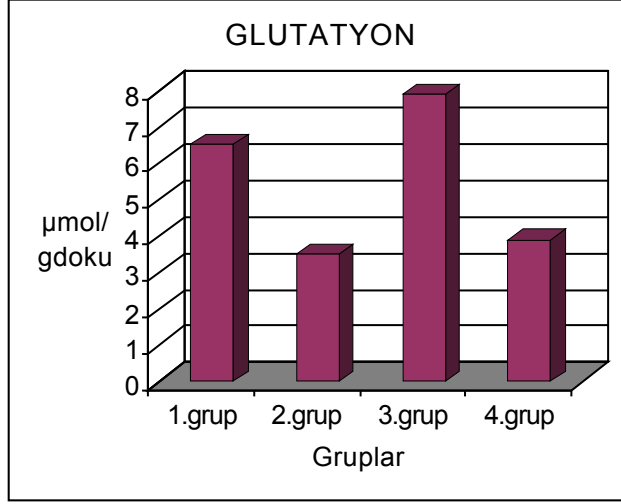
Kontrol grubuna göre kıyaslama, * p<0.001, **p<0.05

CCl₄ grubuna göre kıyaslama, ^a p<0.001

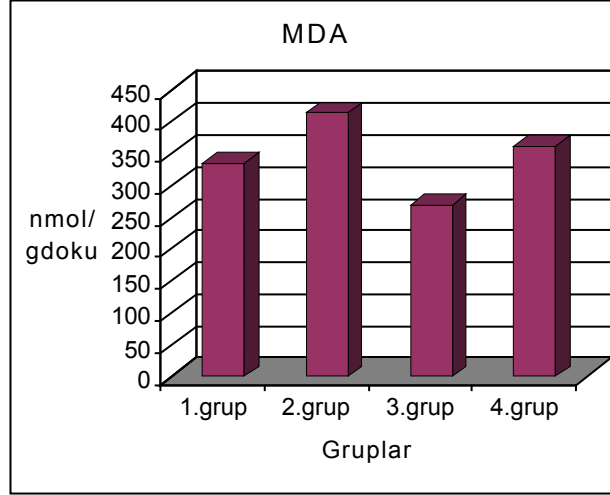
Karaciğer lipid peroksidasyon düzeyleri araştırıldığında, Kontrol + CCl₄ grubunun karaciğer MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). Grup 3'ün karaciğer MDA düzeyleri kontrol grubuna göre azalmıştır (p<0.05). Ekstre+ CCl₄ uygulanan sıçanların karaciğer MDA düzeyleri sadece CCl₄ uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.001).

Kontrol grubuna göre grup 2, ve grup 4'ün plazma MDA değerlerinde anlamlı artışlar gözlenirken (p<0.001), CCl₄ grubuna göre ekstre +CCl₄ grubu plazma MDA değerlerinde %16.2'lik azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.

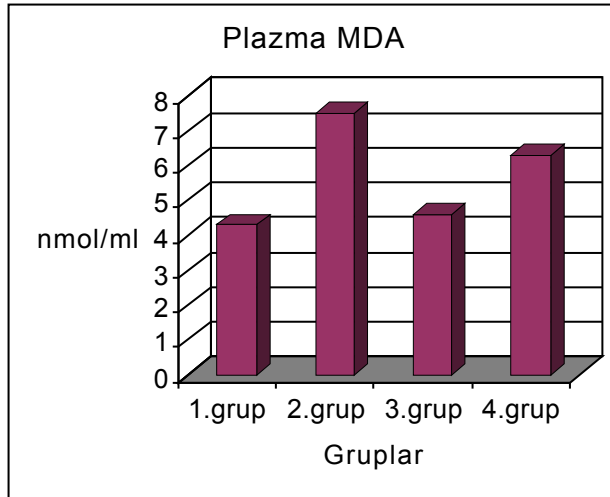
Grupların glutatyon düzeyleri; kontrol grubuna göre kıyaslandığında, ekstre verilen (grup 3) sıçanların karaciğer GSH düzeyleri kontrol grubu seviyelerinde iken CCl₄ ve ekstre + CCl₄ verilen sıçanların GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktür (p<0.001). (Tablo 13)



Grafik 4: Grupların karaciğer glutatyon düzeyleri

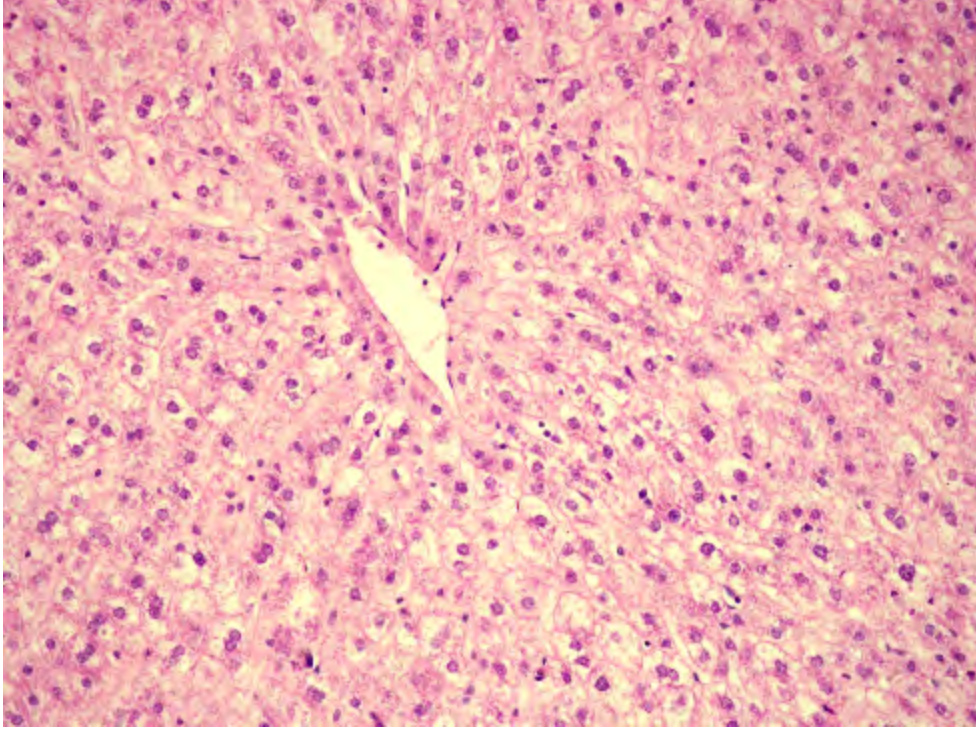


Grafik 5: Grupların karaciğer MDA düzeyleri

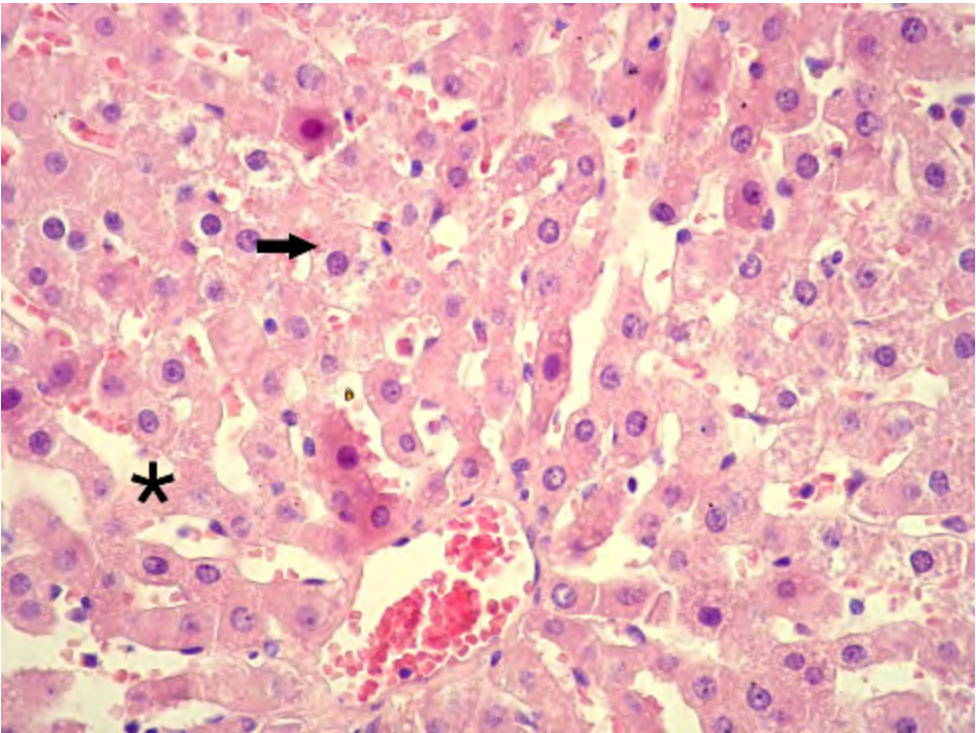


Grafik 6: Grupların plazma MDA düzeyleri

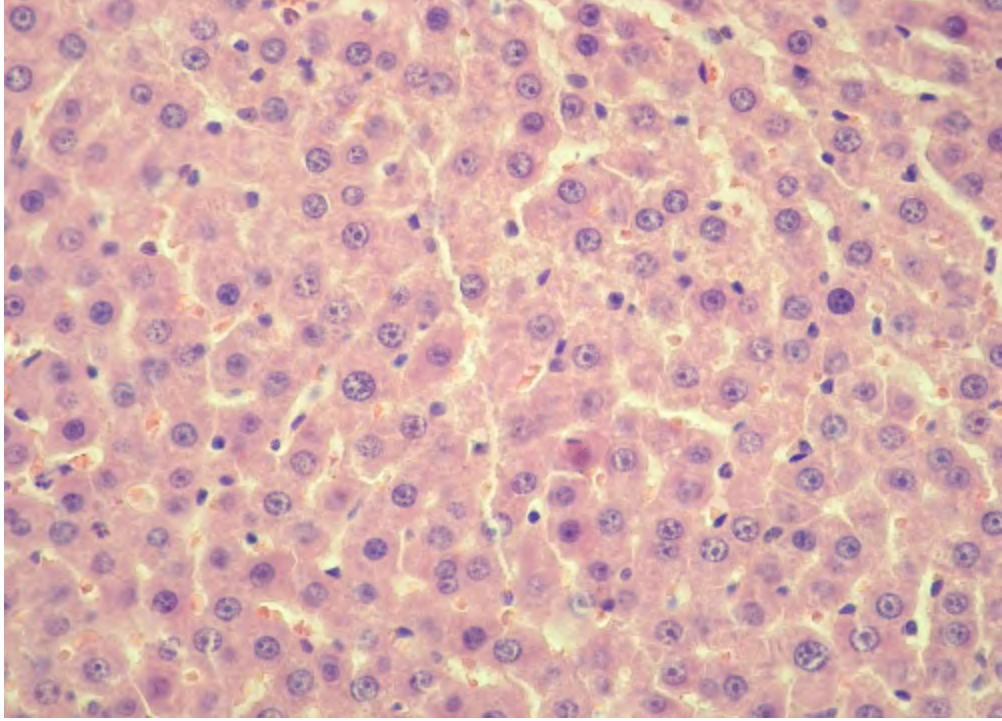
6.3. Histolojik Çalışmalar İle İlgili Elde Edilen Bulgular



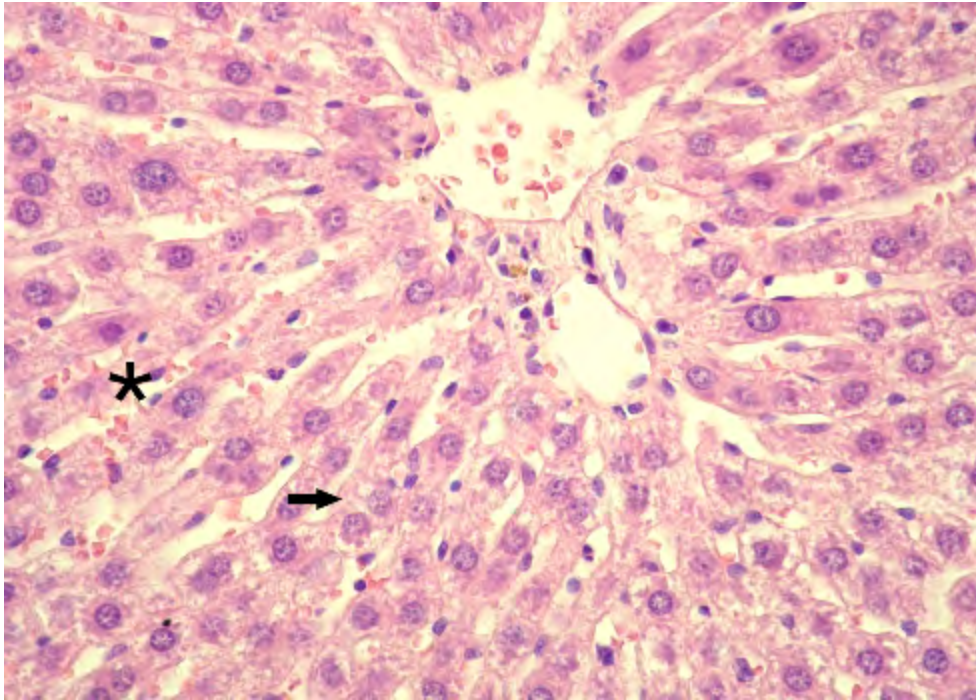
Resim 6: Kontrol grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü
Normal karaciğer yapısı izlenmekteX200



Resim 7: Karbon tetraklorür grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü
Hepatositlerde ileri derecede dejenerasyon (>), Sinuzoidlerde genişleme ve
vazokonjesyon (*) izlenmekteX200
Karbon tetraklorür grubunda hepatositlerde ileri derecede harabiyet gözlenmiştir.



Resim 8: Ekstre grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü:
Normale yakın karaciğer yapısı izlenmekte X200



Resim 9: Karbon tetraklorür+ekstre grubu ışık mikroskobu karaciğer görüntüsü:
Hepatositlerde hafif dejenerasyon (>), Sinuzoidlerde hafif derecede
vazokonjesyon (*) izlenmekte X200
Ekstre + CCl₄ uygulaması CCl₄ 'e bağlı karaciğer harabiyetinin kısmen azalmasını

sağlamıştır.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Deneysel karaciğer harabiyeti oluşturulmasında karbon tetraklorür, klasik ve model bir hepatotoksikandır. Oksijen radikalleri, nükleik asitler, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar değişik kimyasal sınıftan bileşiği hasara uğratabilme kapasitesindedir (9). CCl₄ uygulamasından en fazla etkilenen organ, karaciğerdir (48- 53). Bu maddenin oluşturduğu harabiyetin derecesine bağlı olarak bazı karaciğer enzimlerinin plazmadaki düzeyi fazlalaşır (57, 103, 172, 174, 175). Bu nedenle serum veya plazmadaki bazı enzim aktivitelerindeki değişiklikler, karaciğer hücre hasarının birer göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu enzimler arasında amino transferazlar (ALT ve AST) da vardır. Bu enzim aktivitelerindeki bir artış, aktif karaciğer hasarını yansıtmaktadır (64, 65).

Çalışmamızda karaciğer harabiyeti oluşturmak için karbon tetraklorür kullandık. CCl₄ uyguladığımız sıçanların karaciğer hücrelerinde harabiyete bağlı olarak plazma ALT ve AST enzim seviyeleri yüksek gözlenmiş ve bu sonuç, diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir (173, 174). CCl₄ uygulanmasına bağlı olarak karaciğer lipid peroksit düzeylerinde gözlemlenen artmalar, karbon tetraklorürün karaciğerde lipid peroksidasyonuna neden olduğunu doğrulayan araştırma sonuçları ile uygunluk göstermektedir (174). Bunun yanısıra, yine plazma lipid peroksit düzeylerinde görülen artış, karaciğer harabiyeti sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun plazmaya yansımalarını gösteren diğer çalışmalar ile de aynı yöndedir (175, 103).

Glutatyon, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan ve aralarında karbon tetraklorürün de olduğu birçok ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli görevler üstlenen temel bir bileşiktir. Glutatyon aynı zamanda hücrelerin önemli bir antioksidan bileşiğidir ve herhangi bir nedenle oksidatif stresin arttığı durumlarda hücre içindeki mevcut glutatyon hızla tüketilir(175).

Oksidatif stres kronik hastalıkların etiolojisinde önemli rol oynar, yapılan çalışmalarla pek çok bitkisel ürünün de antioksidan özellikleri nedeniyle bu hastalıklarda koruyucu özelliğe sahip olabileceği gösterilmiştir. Örneğin birçok kronik hastalığın önlenmesi ve tedavisi amacıyla kullanılan sarımsağın en önemli biyokimyasal özelliklerinden biri antioksidan potansiyelidir. Bu özelliğinin içindeki organik kükürt bileşiklerinden ve flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (176). Yine likopen ve diğer karotenoidlerden zengin olan domates ve domates

ürünlerinin kullanımı ile ateroskleroz ve koroner arter hastalığı insidansı arasında bir ilişki bulunmuştur (177).

Urtica dioica' da antioksidan özellikleriyle bu bitkisel besinlere verilebilecek iyi bir örnektir. *Urtica dioica* Dünya üzerinde ve Türkiye'de geniş bir yayılış alanına sahiptir. Bitkinin yetiştiği bölgeler itibarı ile kullanımı incelendiğinde; gerek halk ilacı gerek tıbbi preparat olarak geniş kullanım alanına sahip olduğu görülmektedir.

Genel olarak bitkiler etanol ile ekstrakte edildiğinde glikozidler, saponinler ve alkaloidler etanol fazına geçer. Bu maddelerin yanında hem suda hem de(C vitamini, Se) bazı yağda çözünen (E vitamini gibi) antioksidan bileşikler de kolaylıkla etanol fazına alınır (126). Isırgan tohumu özellikle E vitamini C vitamini ve Se açısından zengindir. Tohumların etanol ekstraksiyonun kullanılması bu nedenle tercih edilmiştir (119). Çalışmamızda ısırgan tohumunun etanol ekstresinin bitkisel proteinler de içerdiğini gösterdik.

Önemli antioksidanlardan E vitamini ile C vitamininin karbon tetraklorür harabiyetini iyileştirici rolü, çeşitli araştırmalarda denenmiştir. Karbon tetraklorür ile birlikte çeşitli halojenli hidrokarbonların denendiği bir çalışmada, E vitamininin karaciğer ve böbrek başta olmak üzere değişik organlarda lipid peroksidasyonunu inhibe edici özelliği rapor edilmiştir (178). Aynı amaçla yapılan bir başka çalışmada, akut ve kronik karbon tetraklorür uygulaması ile yükselen plazma AST enzim aktivitesinin, E vitamininin antioksidan etkisi ile düşürüldüğü bildirilmektedir (179). Bu doğrultuda bir başka çalışmada da, aynı madde kullanılarak yükseltelen plazma ALT enzim aktivitesi yine E vitamini kullanılarak düşürülmüştür (180). Diabetik ratlarda vitamin E'nin bazı serum lipidleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmanın sonuçlarında diyabetik ratlarda vitamin E'nin lipid peroksidasyonunu önleyerek koruyucu ve düzenleyici etki gösterdiği, böylece kalp-damar rahatsızlıklarını engellediği kanaatine ulaşılmıştır (181).

C vitamininin, başlangıç formundaki radikaller üzerine rolü olmasının yanısıra E vitamini ile etkileşim ve membran fosfolipidleriyle arasındaki interaktivite dolayısı ile kuvvetli bir antioksidan olduğu bilinmektedir (73, 94, 98,101, 106). Karbon tetraklorür uygulanan sıçanlar üzerinde yapılan bir deneyde, serbest radikallerin plazma ve karaciğer dokusunda protein ve bilirubin seviyeleri ile plazmada glukoz seviyeleri üzerine etkili olduğu ve bunların seviyelerinde olumsuz azalmalara neden olduğu test

edilmiştir. Bu aşırı azalmaların C vitamini aracılığıyla normal seviyelere gelmesi sağlanmıştır (182). Yapılan çalışmalarda β -karotenin etkin olarak triklor peroksil radikallerini indirgediği bildirilmektedir (72). Haftada üç kere düzenli olarak klasik membranlar kullanılarak diyalize alınan ve B₁₂ vitamini ve folik asit dışında herhangi bir vitamin desteği almayan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada suda çözünen antioksidanların diyaliz süreci boyunca membranlardan belirgin olarak kaybedildikleri, oksidan ajanların üretiminin artması ve rejenerasyonunun C vitamini kaybına bağlı olarak azalması nedenleri ile diyaliz boyunca E vitamini düzeyinin azaldığı, A vitamini düzeyinin ise değişmediği gözlenmiştir (183).

Bitkilerle yapılan çalışmalarda içeriklerinde antioksidan moleküller bulunan bitkilerin lipid peroksidasyonuna etkili oldukları gösterilmiştir. Yurtsever ve arkadaşları tarafından laboratuvarımızda yapılan çalışmada Brassica oleracea var capitata 'dan petrol eteri ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrenin farelerde antimikrobiyal, antitumoral etkileri yanında lipid peroksidasyonunu önleyici etkisi de bulunmuştur (184).

Urtica dioica L. tohumları ile yapılan bir çalışmada, 60 gün ısırgan tohumu yağı etanol ekstresi uygulanmasının, CCl₄ uygulanması ile azalan plazma GSH düzeylerini arttırdığı, ayrıca ısırgan tohumunun karaciğer, glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivelerini artırdığı gösterilmiştir (185).

Çalışmamızda, ısırgan ekstresinin karbon tetraklorür uygulanmasından önce 14 gün enjeksiyonu, sıçanlarda karaciğer hasarı nedeniyle yükselen plazma ALT ve AST enzim aktivitelerinde azalma sağlamıştır. GSH düzeylerinde ise CCl₄ grubuna göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Buna karşılık hazırlamış olduğumuz ısırgan tohumu etanol ekstresi CCl₄ uygulanmasına bağlı olarak artan karaciğer lipid peroksidasyonunu azaltıcı etki göstermiştir. Bu nedenle tek başına ekstre uygulandığında GSH düzeyinde artış görülmesine rağmen ekstre+CCl₄ grubunda GSH düzeyinin düşük olmasının nedeni mevcut GSH'ların lipid peroksidasyonuna karşı kullanılması olabilir. Ekstre uygulanması ile plazma MDA düzeylerinde de bir miktar azalma olmasına karşın bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu durum ekstrenin lipid peroksidasyonunu önleyici etkisinin plazmaya henüz yansımamasından kaynaklanabilir.

İki ay süre ile yemlerine ısırgan otu yaprağı karıştırılarak beslenen sıçanların karaciğer ve plazma lipid peroksit düzeylerinin CCl₄ uygulanmasından sonra kontrol

grubuna göre düşük olduğu bulunmuştur (186) . *Urtica dioica* yapraklarından elde edilen ekstrenin iskemi-reperfüzyon hasarını önleyici etki gösterdiği ve bu etkisinin içeriğindeki antioksidan moleküllerden kaynaklandığı bildirilmiştir (187).

Matsingou ve arkadaşları fosfolipidlerin ve linoleik asidin demir katalizli oksidasyonunun ısırgan otu ile engellenebileceğini gözlemlerken (188), bir başka çalışmada ise ısırgan otunun su ekstresinin linoleik asit peroksidasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (1).

CCl_4 uygulanması sonucu oluşan karaciğer hasarının histolojik incelenmesinde görülen hepatositlerdeki ileri derecede dejenerasyon sinozoidlerde genişleme ve vazokonjesyon ısırgan tohumu ekstresi uygulanmasıyla önemli derecede engellenmiştir. Bu bulgularda diğer bulgularımızla uyumludur. Isırgan otu CCl_4 dışında başka nedenlere bağılı olarak gelişen karaciğer harabiyetini de engellemektedir. Phalloidin'in neden olduğu hafif derecedeki hepatotoksisiteyi *Urtica dioica* tohumu eterik yağının erken dönemlerinden itibaren önleyebileceği gösterilmiştir (189).

Isırgan tohumunun bazı biyokimyasal serum parametreleri üzerine etkileri de araştırılmıştır. Isırgan otu ile yapılan çalışmalarda plazma glukoz düzeylerinde %10'luk azalmalar gözlemlendiği bildirilmektedir (122, 190, 191). Bizim çalışmamızda da ekstre uygulanan grubun plazma glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermezken %14 oranında azalma gözlemlendi. Ekstre + CCl_4 grubunda ise herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Isırgan otu yapraklarının etanol ekstraksiyonunun farelerde plazma LDL kolesterol düzeyini azalttığı gösterilmiştir (192). Bizim bulgularımız da plazma total kolesterol düzeyi değişmezken plazma trigliserid ve VLDL düzeylerinde artışlar gözlemlenmiştir. Bu bulgularımız bu konudaki çalışmalarla uyumlu değildir. Bu durumun yaprak ve tohumların içerik farklılığından kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamız, ısırgan otu tohumunun, karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda, artmış karaciğer lipid peroksit düzeyleri ile plazma ALT ve AST enzim aktivitelerinde sağladığı azalmalar dolayısıyla, bu bitkinin karaciğer hasarını önleyici, lipid peroksidasyonunu inhibe edici özellikte olduğunu ve içeriğinde bulunan vitaminler ve minerallerden kaynaklanabilecek antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ., Oktay M., Büyükokuroğlu M.E.: Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 90: 205-215, 2004.
2. Dypbukt J.M., Thor H., Nicotera P.: Intracellular Ca^{2+} chelators prevent DNA damage and protect hepatoma 1C1C7 cells from quinone-induced cell killing. *Free Radic Res. Commun.*, 8: 347-354, 1990.
3. Aruoma O.I.: Free radicals, oxidative stress, and antioksidants in human health and disease. *JAOCS*, 75: 199- 212, 1998.
4. Halliwell B.: Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J.*, 1: 358-364, 1987.
5. Marx J.L.: Oxygen free radicals linked to many disease. *Science*, 235:529-531, 1987.
6. Young I.S., Woodside J.V.: Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 54: 176-186, 2001.
7. Gutteridge J.M.C.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissues damage. *Clin. Chem.*, 41: 1819-1828, 1995.
8. Fang Y.Z., Yang S., Wu G.: Free radicals, antioksidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872- 879, 2002.
9. Southorn, P.A., Powis G.: Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 381-389,1988.
10. Huyser E.S.: Free Radikal Chain Reactions. John Wiley and Sons, Inc., s. 1-4, 1970.
11. Pryor W.A.: Free radical reactions in biological systems. Pryor, W.A., ed. *Free Radicals in Biology*, vol.1, Academic Press, New York, s. 4-6, 1976.
12. Yoshino K., Hara Y., Sano M.: Antioxidative effects of black tea the-aflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by tert-butyl hydroperoxide. *Biol. Pharm. Bull.*, 17: 146-149, 1994.
13. Janssen YMW, Houten BV, Borm PJA, Mossman BT.: Biology of disease, cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.*, 69: 261-274, 1993.
14. Özdem SS, Şadan G.: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Ü. Tıp Fak. Derg.*, 11: 63-71, 1994.
15. Sinclair AJ, Barnett AH, Junec J.: Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British J. Hosp. Med.*, 43: 334-344, 1990.

16. Yagi K.: Lipid peroxidase and related radicals in clinical medicine. (in) Free Radicals in Diagnostic Medicine. D Armstrong (Editor), pp. 17- 27, Plenum Press, New York, 1994.
17. Papas A.M.: Determinants of antiokxidant status in humans. *Lipids*, 31, 77- 82, 1996.
18. Aruoma O.I., Cuppett S.L.: Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS Press, Champaign, Illinois, p 241, 1997.
19. Kehrer JP.: Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rew. Toxicol.*, 23: 21-48, 1993.
20. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press Oxford, 1989.
21. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.: Oxygene radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 107: 526-545, 1987.
22. Stokinger H.E., Ozone toxicology, *Arch. Environ. Healt.* 10, 719- 731, 1965.
23. Mustafa M.G., Biochemical basis of ozone toxicity,: *Free Rad. Biol. Med.*, 9, 245-265, 1990.
24. Pryor W.A.: Mechanism of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung, *Ibid*, 17, 451-465, 1994.
25. Kanofsky J.R., Sima P.: Singled oxygen production from the reaction of ozone with biological molecules. *Biol. Chem.* 266, 9039- 9042, 1991.
26. Rahman IU, Massaro D.: Endotoxin treatment protects rats against ozone-induced lung edema: with evidence for the role of manganese superoxide dismutase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113: 13–18, 1992.
27. Kanthasamy AG, Ardelt B, Malave A, Mills EM, Powley TL, Borowitz JL, Isom GE.: Reactive oxygen species generated by cyanide mediated toxicity in rat pheochromocytoma cells. *Toxicol. Lett.*, 93: 47-54, 1997.
28. Aruoma O.I. and Cuppett S.L.: Antioxidant Methodology, AOSS Press, ppl-21, 1998.
29. Andria J.H., Higgs A., Moncada S.: Inihition of nitric oxide as a potential therapeutic target. *Amu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:191- 220, 1999.
30. Carr A.C., Van Der Berg J.J.M., Winterbourn C.C.: Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 63- 69, 1996.

31. Dennis W.H., Oliveieri V.P., Kruse C.V.: The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid, *Water Res.*, 13, 357, 362, 1979.
32. Gould J.P., Hay T.R.: The nature of reactions between chlorine and purine and pyrimidine bases: Products and kinetics. *Wat. Res. Tec.* 14, 629- 640, 1982.
33. Babior B.M., Woodman R.C.: Chronic granulomatous disease. *Sem. Hematol.* 27, 247- 259, 1990.
34. Aruoma O.I., Halliwell B.: Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron, lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation. *Ibid.* 241, 273-278, 1987.
35. Halliwell B.: How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication.* 9, 1- 32, 1990.
36. Ünal D.: Serbest radikaller. *Sendrom*, 11 (3): 68- 80, 1999.
37. Dormandy T.L.: An approach to free radicals. *Lancet*, i: 1010- 1014, 1983.
38. Seven A., Candan G.: Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*, 8 (10): 3906- 3911,1995.
39. Akkus İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. No: 38, Mimosza Yayınları, Konya, 1995.
40. Gutteridge J.M.C., Halliwell B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 129-135, 1990.
41. Reiter R.J.: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.*, 9: 526-533, 1995.
42. Southorn P.A., Powis G.: Free radicals in medicine. *Mayo Clin. Proc*, 63: 381-408, 1988.
43. Tribble D.L., Aw T.Y., Jones D.P.: The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*, 7 (2): 377-387, 1987.
44. Kalender S., Kalender Y., Öğütçü A., Uzunhisarcıklı M., Durak D., Açıkgoz F.: Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227- 235, 2002
45. Niki E.: Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids*, 44: 227-253, 1987.
46. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC.: Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16: 259-264, 1990.

47. Porter NA.: Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105: 273-283, 1984.
48. Gutteridge J.M.C., Halliwell B.: *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease.* Oxford University Press, New York, s. 1- 16, 40- 51, 55-59, 93-95, 1994.
49. Edvards M.J., Keller B.J., Kauffman F.C.: The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 119: 275-279, 1993.
50. Elsis A.E.D., Earnest D.L., Sipes I.G.: Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: Enhanced lipid peroxidation without enhanced biotransformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 119: 289-294, 1993.
51. Elsis A.E.D., Earnest D.L., Sipes I.G.: Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: Role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 119: 295-301, 1993.
52. Tribble D.L., Aw, T.Y., Jones D.P.: The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*, 7 : 377-387, 1987.
53. Comporti M.: Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.*, 53: 599-623, 1985.
54. Environmental Health Criteria 208, Carbon tetrachloride. WHO, Finland, 1999.
55. Maxcy R.: Environmental health. Ed.: Last J.M., *Public Health and Preventive Medicine.* Twelfth Ed. s.628- 629, Appleton & Range, California, 1997.
56. Timbrell J.A.: *Principles of Biochemical Toxicology*, "s. 48-53, 126-133, 140-146, 174-175, 184-188 ". Taylor And Francis Ltd. London, 1982.
57. Vural N.: *Toksikoloji. 2. Basım.* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 73, Ankara, 1996.
58. Gruebele A., Zawaski K., Kaplan D., Novak R.F.: Cytochrome P450E1- and cytochrome P450B1/2B2- catalyzed carbon tetrachloride metabolism. *Drug. Metab. Dispos.*, 24: 15-22, 1996.
59. Güven A., Erginsoy S., Kaya N.: Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9: 131-136, 2003.
60. McCay PB, Lai EK, Payer JL, Dubose CM, Janzen EG.: Oxygen and carbon centered radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.*, 259: 2135-2143, 1984.
61. Pohl LR, Mico BA.: Electrophilic halogens as potentially toxic metabolites of halogenated compounds. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 61-64, 1984.

62. Stombeck DR, Guilford WG.: Small Animal Gastroenterology. 2nd edit. Stongate publishing Co., California, 1990.
63. Vural N.: Toksikoloji. A. Ü. Ecz. Fak. Yay. No 56, Ankara, s.179, 384, 464, 1984.
64. Sheweita S.A., Abd El-Gabar M., Bastawy M.: Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolising enzyme in the liver of male rats: Role of antioxidants. *Toxicology*, 165: 217- 224, 2001.
65. Stryer L.: Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, 1995.
66. Anderson S.C., Cocayne S.: Clinical Chemistry: Concepts and Application. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1993.
67. Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L.: Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol: 2, s. 1664, McGraw-Hill Company Inc., New York, 1998.
68. Anderson S.C., Cocayne S.: Clinical Chemistry. Concepts and Applications. W.B.Saunders Company, "s: 248- 252, 286- 287", Philadelphia, 1993.
69. Yenson M.: İnsan Biokimyasi. 5. Basım. s. 669, Beta Basım, İstanbul, 1984.
70. Cook, N.C., Samman, S.: Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76, 1996.
71. Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91 (suppl 3): 14-22, 1991.
72. Seven A., Candan G.: Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Med.* 27: 41-50, 1996.
73. Torun M., Yardım S.: Serbest radikallerin kalp-damar hastalıkları ile ilişkisi ve savunma mekanizmaları. *FABAD*, 18: 173- 184, 1993.
74. Akkuş İ.: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. MIMOZA Yayınları No 38, Sağlık dizisi 5, Konya, 1995.
75. Gültekin F, Delibaş N, Yaşar S, Kılınç İ.: In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch. Toxicol.*, 75: 88-96, 2001.
76. Matés JM.: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83- 104, 2000.
77. Swierczynski J., Kochan Z., Mayer D.: Dietary α -tocopherol prevents dehydroandrosterone-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes and mitochondria. *Toxicol. Lett.*, 91: 129-136, 1997.

78. Nagy I.Z.: Chemistry, toxicology, pharmacology and pharmacokinetics of idebenone : a review. *Arch. Gerontol. Geriat.*, 11: 177-186, 1990.
79. Bao YP, Williamson G., Tew D., Plumb GW, Lambert N., Jones JG, Menon DK.: Antioxidant effects of propofol in human hepatic microsomes: concentration effects and clinical relevance. *British J. Anaesth.*, 81: 584-589, 1998.
80. Porter W.L., Black E.D., Drolet A.M.: Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 615-624, 1989.
81. Frankel E.N., Huang S.W., Kanner J., German J.B.: Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *J. Agric. Food. Chem.*, 42, 1054-1059, 1994.
82. Pryor W.A., Cornicelli J.A., Tait B., Trivedi B.K., Witiak D.T., Wu M.: A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.*, 58, 3521-3532, 1993.
83. Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J.R.S.: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 859-865, 1989.
84. Frankel E.N.: Review: Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Agric.* 54, 495-511, 1991.
85. Foote C.S., Denny R.W., Weaver L., Chang Y., and Peters J.: Quenching of Singled Oxygen. *Ann. NY, Acad. Sci.* 171, 139- 145, 1971.
86. De la Torre Boronat, M.C. and Tamames, L.: El papel de los antioxidantes. *Alimentaria*, 6,19-27, 1997.
87. Moure A, Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., and Parajo J.C.: Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72, 145-171, 2001.
88. Diplock A.T.: Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 189-193, 1991.
89. Halliwell B.: Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J.*, 1: 358-364, 1987.
90. Köşkeröğlu İ.Ş.: Oral Mukozada Oluşturulmuş Yumuşak Doku Defektinin İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine E Vitamini Ve Selenyumun Etkisinin Deneysel Olarak Araştırılması. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, İstanbul, 1998 (Danışman: Prof.Dr. Zerrin Çebi).

91. Sies H.: Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, 91 (suppl 3c): 31-38, 1991.
92. Kaya S., Pirinççi İ., Bilgili A.: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*: 35, Ankara, s. 222, 232, 273, 276, 355, 1998.
93. Meister A.: Glutathione. Ed: Arias I., Popper H., Schachter D., Shaftitz D.A, *The Liver: Biology and Pathobiology*. S. 297-305, Raven Press, New York, 1982.
94. Bast A., Haenen G.R.M.M., Doelman C.J.A.: Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J. Med.*, 91 (Suppl 3): 2-12, 1991.
95. Bekerecioğlu M., Ugraş S., Dilek O.N., Tercan M., Özyazgan İ.: Serbest radikaller. Temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri. *Sendrom*, 10 (3): 85- 95, 1998.
96. Freeman B.A., Crapo J.D.: Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47 (5): 412-426, 1982.
97. Rose R.C., Bode M.A.: Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. *FASEB J.*, 7: 1135-1142, 1993.
98. Bodannes R., Chan P.: Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett*, 105 (2): 195- 196, 1979.
99. Meister A.: Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220: 472-477, 1983.
100. Monte M., Lustig E.S.: Free radicals of oxygen and superoxide dismutase. Biological and medical aspects. *Medicina*, 54 (1): 61- 68, 1994.
101. Kazanç M.B.: Antioksidan vitaminler. *Sendrom*, 9 (7): 14- 23, 1997.
102. Portakal S.: Besinler ile aldığımız E Vitamini. *Doğa*, 8 (2): 273- 281, 1984.
103. Yamazaki K., Ohyama H., Kurata K., Wakabayashi T.: Effects of dietary vitamin E on clinical course and plasma glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase activities in hereditary hepatitis of LEC rats. *Lab. Anim. Sci.*, 43(1): 61-67, 1993.
104. Sato Y., Hagiwara K., Arai H., Inoue K.: Purification and characterization of the α -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS Lett*, 288 (1, 2): 41- 45, 1991.
105. Burton G.W., Joyce A., Ingold K.U.: First proof that Vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*, i: 327, 1982.
106. Packer J.E., Slater T.F., Willson R.L.: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-738, 1979.

107. Mukai K., Morimoto H., Kikuchi S., Nagaoka S.: Kinetic study of free radical scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol kinon) in solution. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1157: 313-317, 1993.
108. Olson J.A., Krinsky N.I.: Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators. *FASEB J.*, 9: 1547-1550, 1995.
109. Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D.: Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007- 1011, 1993.
110. Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B.S., Toshima H., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B.: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, 155, 381-386, 1995.
111. Knekt P., Järvinen R., Reunanen A., Maatela J.: Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.*, 312, 478-481, 1996.
112. Knekt P., Järvinen R., Seppänen R., Heliövaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A.: Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol*, 146, 223-230, 1997.
113. Foo L.Y., Porter L.J.: The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 711-716, 1981.
114. Namiki M.: Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 29, 273-300, 1990.
115. Larson R.A.: The antioxidants of higher plants. *Pytochemistry*, 27 (4), 969- 978, 1988.
116. Hudson B.J.F.: *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London and New York, p 1- 316, 1990.
117. Endo Y., Usuki, R. and Kareda, T.: Antioxidant effects on chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark II. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 62 (9), 1387-90, 1985.
118. Gülçin İ., Oktay M., Küfrevioğlu Ö.İ and Aslan, A.: Determination of antioxidant activity of Lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79 (3), 325- 329, 2002.

119. Wetherilt H.: Isırgan Otu Yaprak ve Tohumlarının Besleyici Özellikleri ve Antitümoral Etkileri. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 1989 (Danışman: Prof.Dr. A. Baysal).
120. Furnivall F.J.: The First Booke of the Introduction of knowledge made by Andrew Borde. Early English Text Society, London, 1970.
121. Chaurasia N.: Phytochemische, Untersuchungen Einiger Urtica-Arten Unter Besonderer Berücksichtigung Der Inhaltsstoffe Von Radix Und Flores Urticae dioicae L. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doctorwürde. Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität, Marburg/Lahn, 353 s., 1987.
122. Atası E., Cihangir V.: Urtica dioica L. Türlerinin Kimyasal İçeriği ve Tedavide Kullanımı. FABAD, 9: 73-81, 1984.
123. Borchers A.T., Keen C.L., Stern J.S., Gershwin M.E.: Inflammation and native American medicine: The role of botanicals. Am. J. Clin. Nutr. 72: 339- 347, 2000.
124. Madaus G. 1938: Lehrbuch der Biologischen Heilmittel Abt.I.: Heilpflanzen, Bd. I ve II. Thieme Verlag, Leipzig.
125. Keeser E.: Zür Wirkungsweise der Brennessel. Deut.Med. Wochenschrift, 66: 849, 1940.
126. Baytop T.:Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. (Geçmişten günümüze) Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, (ilaveli ikinci baskı), s 231-232 1999.
127. Baytop A.: Tibbi Bitkiler Atlası, İstanbul Üniversitesi Yayınları , No 2421, s. 12, 1978.
128. Karamanoğlu K.: Farmasotik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları , No 44. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 483 s, 1977.
129. Yakar-Tan N. ve Bilge E.: Genel Botanik. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayını, No. 150. s.69, 1979.
130. Tuzlacı E. and Erol M.K.: Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğridir (Isparta), Fitoterapia, 70, 593-610, 1999.
131. Asıngıl A.: Şifalı Bitkiler, Timaş Yayınları, İstanbul, s 133-134, 1997.
132. Barlow R.B. ve Dixom R.O.D.: Cholinacetyl transferase in the nettle Urtica dioica. Biochem. J. , 134:15-18, 1973
133. Smallman B.N. ve Maneckjeea.: The synthesis of acetylcholine by plants. Biochem.J., 194(I):361-4, 1981

134. Roshchina V.V. ve Mukhin E.N.: Acetylcholinesterase activity of chloroplasts of higher plants. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 278(3):754-7, 1984.
135. Welander M.: Enzyme activities in *Urtica dioica*. Effects of daylight and leaf age on glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase. *Physiol. Plant.*, 30 (3):192-9, 1974.
136. Welander M.: The effect of mercaptoethanol on the activity of enzymes of nitrogen metabolism in leaves from *Urtica dioica* and *Spinacia oleracea*. *Physiol.Plant.*, 43(3) :242-6, 1978.
137. Emmelin N. and Feldberg W.: The mechanism of the sting of the common nettle. *J.Physiol.*, 106:440, 1948.
138. Collier H.O.J, ve Chester G.B.: Identification of 5-hydroxytryptamin in the sting of the nettle. *British J. Pharmacol.*, 11:86, 1956.
139. Atasu E. ve Cihangir V.: *Urtica L.* türlerinin kimyasal içeriği ve tedavide kullanımı. *FABAD Farmasotik Bilimler Dergisi*, 9(2):73-81, 1984.
140. Rusnitschek-Schimmel I.: Seasonal dynamics of nitrogenous compounds in a nitrophilic weed. Changes in inorganic and organic nitrogen fractions of the different plant parts of *Urtica dioica*. *Plant Cell Physiol.*, 26(1):169-76, 1985.
141. Rysin L.P. ve Antyukhina V.V.: Chemical composition of grass-underbush plants in pin forests of the Moscow district. *Lesovedenic*, 1:36-47, 1977.
142. Zulfugarly D.I., Alieva G.V., Arslanbekova M.A., Kazanbieva M.A. ve Lolua A.M.: Trace element level in medicinal plants. *Azerb. Khim. Zh.*, 2:84-8, 1982.
143. Lotti G., Paradossi C. ve Marchini F.: Caratterizzazione analitica di nuovi olii di semi. *Riv.Soc.Ital.Sci.Aliment.*, 14(4):263-70, 1985.
144. Garnier G., Bezanger B.L., ve Debraux G.: *Resources medicinales dela Flore Francaise: Tome 1. Vigos Freres (ed.), Paris.,1961.*
145. Falkowskl M.ve Kukulka I.: Chlorophyll content as an indicator of biological properties of meadow plants. *Rocz. Nauk Ruln, Ser.F.*, 79(3): 105-112, 1977.
146. Popova I.A., Maslova T.G. , Popova O.F., Miroslovov E.A. ve Tsarkova V.A.: Characteristics of the photosynthetic appratus of stinging nettle growing under various light conditions. *Fiziol.Rast.*, 29(6):1102-8, 1982.
147. Kudritskaya S.E., Fishman G.M. , Zagorodskaya L.M. ve Chikovani D.M.: Carotenoids of *Urtica dioica*. *Khim. Prir. Soedin.* , 5:640-1, 1986.

148. Bonetti M., Brunetti N., Caserta G., Framondino U. , Marzetti P. ve Pacciaroni F.: Biogas production from biomass. Com.Naz.Energ. Nucl., CNEN-RT/B10 81(6),48 s., 1981.
149. Peumans W.J., De Ley M., Broekaert W.F.: An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomas. FEBS Lett., 177 (1): 99-103, 1984.
150. Rovira P., Buckle M., Abastado J.P., Peumans W.J., Truffa B.P.: Major histocompatibility class I molecules present UDA, a superantigen of vegetal origin, to T lymphocytes. Eur. J. Immunol., 29 (5): 1571-1580, 1999.
151. Van Damme E.J.M., Broekaert W.F., Peumans W.J.: The *Urtica dioica* agglutinin is a complex mixture of isolectins. Plant Physiol., 86: 598-601, 1998.
152. Wagner H., Wilier F., Kreher B.: Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*. Planta Med., 55: 452-454, 1989.
153. Akbay H.: *Urtica dioica* L. üzerine Farmakognozük Araştırmalar. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 1995 (Danışman: Prof.Dr. Ahmet Basaran).
154. Broekaert W.F., Parij's J.V., Leyns F., Joas H., Pevmans W.J.: A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. Science, 245: 1100- 1102, 1989.
155. Tahri A., Yamani S., Legssyer A., Aziz M., Mekhfi H., Bnouham M., Ziyat A.: Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. J. Ethnopharmacol., 73 (1, 2): 95-100, 2000.
156. Czygan F-C, Frohne D., Holtzel C., Nagell A., Pfander J., Willuhn G., Butt W.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. 3.Ed. s.502- 509, CRC Press, Stuttgart, 1994.
157. Chrubasik S., Eisenberg E.: Treatment of rheumatic pain with kampo medicine in Europe. Part 2. *Urtica dioica*. Pain Clinic, 11 (3): 179- 185, 1999.
158. Reihemann K., Behnke B., Schulze-Osthoff K.: Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kB. FEBS Lett., 442: 89-94, 1999.
159. Zeybek N., Zeybek U.: Farmasötük Botanik Ders Kitabı. Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematiği ve Önemli Maddeleri. No:2, "s. 155-156, 175-176", Ege Ü. Ecz. Fak. Yayınları, İzmir, 1994.

160. Ganßer D., Spiteller G.: Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. *Planta Med.*, 61: 138-140, 1995.
161. Hirano T., Homma M., Oka K.: Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na⁺, K⁺-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Med.*, 60: 30-33, 1994.
162. Palozza P., Krinsky N.: Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro. *Methods Enzymol.*, 213: 403-420, 1992.
163. Tsuchiya M., Scita G., Freisleben H.J., Kagan V.E., Packer L.: Antioxidant radical-scavenging activity of carotenoids and retinoids compared to α -Tocopherol. *Methods Enzymolog.*, 213: 460-472, 1992.
164. Gey K.F.: Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: Threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J. Nutr. Biochem.*, 6, 206-236, 1995.
165. Yurdakök M., Qaglar M., Yurdakök K.: Sıçanlarda vitamin E ve selenyumun karbon tetraklorür hepatotoksisitesine karşı etkileri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 18 (1): 10- 17, 1985.
166. Mascio P., Murphy M.E., Sies H.: Antioxidant defence systems: The role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 194-200, 1991.
167. Bisby R.H., Parker A.W.: Reactions of the α -tokopheroxyl radical in micellar solutions studied by nanosecond laser flash photolysis. *FEBS Lett.*, 290 (1, 2): 205-208, 1991.
168. Bors W., Heller W., Michel C, Slettmaier K.: Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology. Ed: Cadenas E., Packer L., *Handbook of Antioxidants*. s. 409-466, MerceL Dekker Inc., New York, 1996.
169. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358, 1979.
170. Ellman G.L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77, 1959.
171. Yagi K.: Assay for blood plazma or serum. *Methods Enzymol.*, 105: 328-331, 1984.
172. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L, Randall R.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193:265.1951.

173. Czaja M.J., Xu J., Alt E.: Prevention of carbon tetrachloride induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology*, 108: 1849-1854, 1995.
174. Letteron P., Labbe G., Deqott C, Berson A.: Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Pharmacol.* 39 (12): 2027- 2034, 1990.
175. Uzel N.: Karbon Tetraklorür Uygulanan Sıçanlarda Lipid Peroksitlerinin Plazma Lesitin-Kolesterol Açıl Transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 1988 (Danışman: Doç.Dr. A. Sivas).
176. Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK.: Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytother Res* 2003; 17: 97-106.
177. Rao AV, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 563-569.
178. Gavino V.C., Dillard C.J., Tappel A.L.: Release of ethane and pentane from rat tissue slices: Effects of Vitamin E, halogenated hydrocarbons and iron overload. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233: 741-747, 1984.
179. Parola M., Leonarduzzi G., Biasi F., Albano E., Biocca M.E., Poli G., Dianzani M.: Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*, 16: 1014- 1021, 1992.
180. Yao T., Esposti S.D., Huang L., Arnon R., Spangenberger A., Zern M.A.: Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E. *Am. J. Physiol*, 267: G476-G484, 1994.
181. Çelik S., Yılmaz Ö.: Diabetik ratlarda vitamin E'nin serum lipitleri ve lipit peroksidasyonu üzerine etkisi. *Tubitak Tr. J. of Biology* 23 39- 46, 1999.
182. Ademuyiva O., Adesanya O., Ajuwon O.R.: Vit C in CC1₄ hepatotoxicity. A preliminary report. *Hum. Exp. Toxicol.* ,13: 107- 109, 1994.
183. Yılmaz F.M., Çelebi N., Duranay M., Yılmaz H., Kazan N., Yücel D.: Bir grup kronik böbrek yetmezliği hastasında hemodiyaliz C, E ve A vitamini düzeyleri üzerine olan etkisi *Turk J Biochem.* 28 (2); 35- 39. 2003.
184. Yurtsever E., Tamer L., Yaman A., İspir T., Yardımcı T.: The effect of extract of *Brassica oleracea* var. *capitata* on lipid peroxidation in *Mus musculus* BALB/C mice. First international Meeting on Pharmacy Pharmaceutical Sciences, İstanbul, 4-7 September 1994.

185. Kanter M., Coşkun Ö., Budancamanak M.: Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats *World J Gastroenterol*, 14;11(42): 6684-6688, 2005.
186. Özmen R.: Isırgan Otu Yaprağı ile beslenen sıçanlarda, akut karbon tetraklorür uygulamasının plazma ve karaciğer lipid perosidasyonu ile glutatyon seviyelerine etkisi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2001 (Danışman: Yrd.Doç.Dr. B. Göker).
187. Cetinus E., Kilinc M., Inanc F., Belge E., Kurutas and Buzkan N.: The Role of *Urtica dioica* (Urticaceae) in the Prevention of Oxidative Stress Caused by Tourniquet Application in Rats, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 205 (3), 215-221, 2005.
188. Matsingou T.C., Kapsokefalou M., Safiloglou A.: "Aqueous infusions of Mediterranean herbs exhibits antioxidant activity towards iron-promoted oxidation of phospholipids, linoleic acid, and deoxyribose." *Free Radical Research*. V35 596- 605. 2001
189. Özbek H., Tuncer İ., Dülger H., Uğraş S., Bayram İ., Türkdoğan K., Uygan İ.: E Vitamini, N-Asetil Sistein, Penisilin-G ve *Urtica dioica* L.'nin Phalloidin Toksisitesi Üzerine Etkileri *Van Tıp Dergisi*, Cilt: 12, Sayı: 1, Ocak/2005.
190. Bnouham M., Merhfour F.Z., Ziyat A., Mekhfi H., Aziz M., Legssyer A.: Antihyperglysemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74, 677- 681, 2003.
191. Farzami B., Ahmadvan D., Vardasbi S., Majin F.J., Khaghani Sh.: Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhands and its in vivo effects in normal and stretozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 89, 47- 53, 2003.
192. Avcı G., Kupeli E., Eryavuz A., Yesilada E., Kucukkurt I.: Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine *J. Ethnopharmacol.* 107(3): 418- 423, 2006.

9. ÖZGEÇMİŞ

11.06.1982 Konya doğumlu. İlk ve orta öğrenimini Osmaniye’de tamamladı. 2000 yılında girdiği Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü’nden 2004 yılında mezun oldu. 2004/2005 eğitim-öğretim döneminden bu yana özel öğretim kurumlarında Fen Bilgisi öğretmenliği yapmaktadır.

10.ETİK KURUL ONAYI



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU**

PROJENİN ADI : Isırgan otu (*Urtica dioica*) tohumu ekstresinin, akut karbon tetraklorür uygulanan albino sıçanlarda plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonu ile glutatyon düzeylerine etkisi.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd.Doç.Dr. Ertuğrul YURTSEVER

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Ayşegül GÜMÜŞ

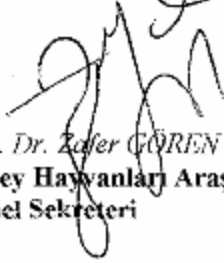
PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD- M.Ü Deneysel Araştırma ve Hayvan Lab.

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 14.04.2006- 62.2005.mar

Sayın : Yrd.Doç.Dr. Ertuğrul YURTSEVER

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na "Isırgan otu (*Urtica dioica*) tohumu ekstresinin, akut karbon tetraklorür uygulanan albino sıçanlarda plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonu ile glutatyon düzeylerine etkisi." isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.


Doç. Dr. Zafer GÖREN
Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu
Genel Sekreteri

Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN
Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Doç. Dr. Zafer GÖREN
Öğr. Gör. Gürkan SERT
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir.