

**BAZI BİTKİLERİN ANTiOKSİDANT  
AKTİVİTESİNİN *IN VITRO* VE  
*IN VIVO* ARAŞTIRILMASI**

**Tevfik ÖZEN**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**İC. YÜKSEK LİSANS ENSTİTÜSÜ  
DOKÜMANLAMA MERKEZİ**

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİLERİN ANTIOKSİDANT AKTİVİTESİNİN  
*IN VITRO* VE *IN VIVO* ARAŞTIRILMASI

Tevfik ÖZEN

136042

DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Halil KORKMAZ

SAMSUN-2003

136042

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 01/03/2005 tarihinde yapılan sınav ile Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İsmail E. GÜMRÜKÇÜOĞLU

Üye : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Üye : Prof. Dr. Halil KORKMAZ (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Hamdi Güray KUTBAY

Üye : Doç. Dr. Nihat TINKILIÇ

ONAY :

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

.../.../...  


Prof. Dr. A. Nur ONAR  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**BAZI BİTKİLERİN ANTIOKSİDANT AKTİVİTESİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*  
ARAŞTIRILMASI  
ÖZET**

*Origanum vulgare* L., *Thymus leucotrichus* L., *Origanum laevigatum* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L., *Urtica dioica* L., *Satureja hortensis* L., *Viscum album* L., *Hypericum venustum* Fenzl. ve *Urtica pilulifera* L. nin etil alkol-su ekstraktının antioksidant aktivitesi, Tiyosiyanat Yöntemi'ne göre tayin edilmiştir. Antioksidant aktivitenin belirteci olan indirgeme gücü Oyaizu Yöntemi'ne göre tayin edilmiştir. Bitki ekstraktlarının antioksidant aktivitesi ve indirgeme gücü L-askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, bütillenmişhidroksianisol (BHA) ve bütillenmişhidroksitoluen (BHT) ile karşılaştırılmıştır. *Urtica dioica* L. ve BHA ve örneklere göre yüksek antioksidant aktivite ve indirgeme gücü gösterdiğinden *in vivo* çalışmalarda kullanıldı.

*In vivo* çalışmada, *Urtica dioica* L. nin iki farklı dozunun (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı) ve BHA etkisi *Swiss albino* karaciğerinde, faz I ve II enzimler, antioksidant enzimler, laktat dehidrogenaz (LDH), lipid peroksidasyon (LPO) ve sülfidril grupları (-SH) tayin edilmiştir. BHA ve iki farklı dozun etkisi de akciğer, böbrek ve özofagusta antioksidant ve faz II enzim aktiviteleri tayin edilmiştir.

Karaciğerde, sitokrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>), NADH sitokrom b<sub>5</sub> redüktaz (cyt b<sub>5</sub> R), glutatyon S-transferaz (GST), DT-diasosforaz (DTD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktiviteleri uygulanan her iki dozda önemli derecede artış gözlenmiştir. Ekstrakt uygulanan her iki grupta sitokrom P450, (cyt P450), toplam sülfidril grupları (T-SH), proteik olmayan sülfidril grupları (NP-SH) ve proteik bağlı sülfidril grupları (PB-SH), LPO, NADPH sitokrom P450 redüktaz (cyt P450 R) ve LDH aktivitelerinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. BHA uygulanan *Swiss albino* karaciğerinde LDH, cyt P450, cyt P450 R, cyt b<sub>5</sub> R, GST, KAT ve PB-SH düzeyleri önemli derecede azalmasına karşın, cyt b<sub>5</sub>, DTD, T-SH, NP-SH, GPx, GR, SOD düzeylerinde önemli derecede artış gözlenmiştir. Uygulanan her iki doz böbrekte SOD ve KAT, akciğerde SOD, KAT ve DTD, özofagusta GST, DTD, SOD ve KAT aktivitesine etki göstermiştir. BHA uygulanan *Swiss albino* akciğer, böbrek ve özofagus organlarındaki antioksidant parametreler, DTD ve GST aktivitelerinde önemli derecede artış gözlenmiştir.

Bu *in vivo* çalışmanın sonuçları *Urtica dioica* L. ekstraktının antioksidant profili ve kimyasal koruyucu potansiyeli hakkında çok önemli ipuçları gösterebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki, antioksidant aktivite, indirgeme gücü, antioksidant enzimler, faz I ve faz II enzimler, *Urtica dioica* L., kimyasal koruyucu

**INVESTIGATION OF SOME PLANTS ANTIOXIDANT ACTIVITIES  
IN VITRO AND IN VIVO  
ABSTRACT**

The antioxidant activity of an ethanol-water extract of *Origanum vulgare* L., *Thymus leucotrichus* L., *Origanum laevigatum* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L., *Urtica dioica* L., *Satureja hortensis* L., *Viscum album* L., *Hypericum venustum* Fenzl. *Urtica pilulifera* L. was determined by the Thiocyanate Method. The reducing power, which is an indicator of antioxidant activity, was determined by Oyaizu Method. The antioxidant activity and reducing power of the plant extracts were compared with L-ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, butylatedhydroxyanisole (BHA) and butylatedhydroxytoluene (BHT). As *Urtica dioica* L. and BHA showed higher antioxidant activity and reducing power than those of the control and samples, they were used *in vivo* studies.

In the *in vivo* studies, the effect of two different doses of (50 and 100 mg/kg body weight) *Urtica dioica* L. and BHA was investigated, for phase I and II enzymes, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase (LDH), lipid peroxidation (LPO) and sulfhydryl groups (-SH) in the liver of *Swiss albino*. The effect of two doses and BHA was also observed for the activities of antioxidant and phase II enzymes on the kidney, lung and forestomach of *Swiss albino*.

The activities of cytochrome b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>), NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase (cyt b<sub>5</sub> R), glutathione S-transferase (GST), DT-diaphorase (DTD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) exhibited a significant increase at both dose levels of extract treatment in the liver. Both extract treated groups were observed to lower the activity of cytochrome P450 (cyt P450), LDH, NADPH-cytochrome P450 reductase (cyt P450 R), LPO, total sulfhydryl groups (T-SH), nonprotein sulfhydryl groups (NP-SH) and protein-bound sulfhydryl groups (PB-SH) significantly. BHA treated mice showed a notable increase in levels of cyt b<sub>5</sub>, DTD, T-SH, PB-SH, GPx, GR, SOD in liver, while LDH, cyt P450, cyt P450 R, cyt b<sub>5</sub> R, GST, NP-SH, CAT levels were reduced significantly. The extract was effective in inducing SOD and CAT in lung, SOD and CAT in lung GST, DTD, SOD and CAT in forestomach at both dose levels of treatment. BHA treated *Swiss albino* induced DTD, GST and all antioxidative parameters significantly in kidney, lung and forestomach.

The results of the present *in vivo* study may indicate very important implications on the chemopreventive potentials and antioxidant profiles of *Urtica dioica* L. extract.

**Key Words:** Plant, antioxidant activity, reducing power, antioxidant enzymes, phase I and phase II enzymes, *Urtica dioica* L., chemoprevention

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Programı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasını planlayan, çalışma süresince her konuda yardımcı olan, ilgi ve desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Prof. Dr. Halil Korkmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin teşhisinde yardımcı olan O.M.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Hamdi Güray Kutbay'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarına imkan sağlayan ve yardımcı olan, O.M.Ü. Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi yöneticilerinden Prof. Dr. Ferişt Kolbakır, Yrd. Doç. Dr. Murat Hökelek, Mustafa İnci, O.M.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Nusret Çiftçi, Arş. Gör. Levent Tümkaya, O.M.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Zafer Eren, Yrd. Doç. Dr. Haydar Karakaya, Arş. Gör. Dr. Birsen Aydın, Arş. Gör. Melike Çebi, İstatistik Bölümü'nden Arş. Gör. Erol Eğrioğlu, Arş. Gör. Yüksel Terzi, Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Beytullah Afşin, Arş. Gör. Osman Çubuk, Uzm. Kazım Canbolat, Uzm. Mustafa Al ve yardımlarını esirgemeyen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca beni bu günlere yetiştiren anneme, babama ve desteğini esirgemeyen eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmam O.M.Ü. araştırma fonu tarafından desteklendiğinden ve yardımlarından dolayı ilgili yetkililere teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>1</b>
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bitki Seçimi.....	2
1.3. Bitki Materyallerinin Hazırlanması ve Aktif Bileşiklerin Saflaştırılması.....	3
1.4. Bitki Materyallerindeki Antioksidant Bileşikler.....	6
1.4.1. Polifenoller.....	6
1.4.1.1. Polifenollerin Antioksidant Aktivitesi.....	7
1.4.2. Karotenoidler.....	8
1.4.2.1. Karotenoidlerin Antioksidant Aktivitesi.....	9
1.5. <i>In vitro</i> Çalışmalarda Kullanılan Bitkiler.....	9
1.5.1. <i>Origanum vulgare</i> L. (İstanbul kekiği).....	9
1.5.2. <i>Thymus leucotrichus</i> L. (Kekik).....	9
1.5.3. <i>Origanum laevigatum</i> L. (Mercan köşk).....	9
1.5.4. <i>Ocimum basilicum</i> L. (Reyhan otu).....	10
1.5.5. <i>Mentha spicata</i> L. (Kıvırcık nane).....	10
1.5.6. <i>Urtica dioica</i> L. (İsırgan otu).....	10
1.5.7. <i>Urtica pilulifera</i> L. (Karaisırgan otu).....	11
1.5.8. <i>Satureja hortensis</i> L. (Geyik otu).....	11
1.5.9. <i>Viscum album</i> L. (Ökse otu).....	11
1.5.10. <i>Hypericum venustum</i> Fenzl. (Binbirdelik otu).....	11
1.6. Biyolojik Sistemlerde Serbest Oksijen Radikalleri.....	12
1.6.1. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	14
1.6.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	17
1.6.2.1. Membran Lipidlerine Etkileri.....	17
1.6.2.2. Proteinlere Etkileri.....	18
1.6.2.3. Nükleik Asitlere Etkileri.....	19
1.6.2.4. Karbohidratlara Etkileri.....	20
1.7. Antioksidant Enzimler.....	20
1.7.1. Süperoksit Dismutaz (E.C. 1.15.1.1).....	22
1.7.2. Katalaz (E.C. 1.11.1.6).....	23
1.7.3. Glutatyon Peroksidaz (E.C. 1.11.1.9).....	23
1.7.4. Glutatyon Redüktaz (E.C. 1.6.4.2).....	24

1.7.5. Sülfidril Grupları .....	24
1.8. Lipid Peroksidasyonu .....	25
1.9. Antioksidant Maddeler .....	26
1.9.1. L-Askorbik Asit .....	26
1.9.2. $\alpha$ -Tokoferol .....	27
1.9.3. Bütillenmişhidroksitoluen (BHT) .....	28
1.9.4. Bütillenmişhidroksianisol (BHA) .....	28
1.9.5. BHT ve BHA' nın Antioksidant Aktivitesi .....	29
1.10. İlaç Metabolize Eden Enzimler .....	31
1.10.1. Faz I .....	33
1.10.2. Faz II .....	36
1.10.2.1. Glutasyon S-Transferaz (E.C. 2.5.1.18) .....	36
1.10.2.2. DT-diafosforaz (E.C. 1.6.99.2) .....	37
1.11. Laktat Dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.27) .....	37
1.12. Çalışmanın Amacı .....	39
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>41</b>
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	41
2.2. Kullanılan Cihazlar .....	41
2.3. <i>In vitro</i> Deneysel Çalışmalar .....	41
2.3.1. Antioksidant Aktivite Tayini .....	42
2.3.2. İndirgeme Gücü Tayini .....	43
2.3.3. Bitkilerin ve Standart Antioksidant Maddelerin İnhibisyon Değerlerinin Hesaplanması .....	43
2.4. <i>In vivo</i> Deneysel Çalışmalar .....	43
2.4.1. Deney Hayvanı ( <i>Swiss albino</i> ) .....	43
2.4.1.1. Deney Hayvanı ( <i>Swiss albino</i> ) Yemi Bileşeni ve Besin Değerleri .....	43
2.4.1.2. Deneysel Uygulama .....	44
2.4.2. <i>In vivo</i> Biyokimyasal Çalışmalar .....	44
2.4.2.1. Karaciğer Hücre Mikrozomal ve Sitozolik Fraksiyonlarının Hazırlanması .....	45
2.4.2.2. Böbrek, Akciğer ve Özofagus Hücre Sitozolik Fraksiyonlarının Hazırlanması .....	45
2.4.2.3. Protein Tayini .....	46
2.4.3. Antioksidant Enzimler .....	46



2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini .....	47
2.4.3.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini .....	47
2.4.3.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini .....	48
2.4.3.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Tayini .....	49
2.4.3.6. Elman Reaktifi ile Dokularda Sülfidril Gruplarının Tayini .....	49
2.4.3.6.1. Toplam Sülfidril Gruplarının Tayini (T-SH) .....	50
2.4.3.6.2. Proteik Olmayan Sülfidril Gruplarını Tayini (NP-SH) .....	50
2.4.3.6.3. Proteik Bağlı Sülfidril Gruplarını Tayini (PB-SH) .....	50
2.4.4. İlaç Metabolize Eden Enzimlerin Tayini .....	50
2.4.4.1. Faz I .....	50
2.4.4.1.1. Cyt P450 Tayini .....	50
2.4.4.1.2. Cyt b <sub>5</sub> Tayini .....	51
2.4.4.1.3. NADPH Bağımlı Cyt P450 Redüktaz Aktivitesinin Tayini .....	51
2.4.4.1.4. NADH-Bağımlı Cyt b <sub>5</sub> Redüktaz Aktivitesinin Tayini .....	51
2.4.4.2. Faz II .....	52
2.4.4.2.1. DT-diafosforaz Aktivitesinin Tayini .....	52
2.4.4.2.2. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini .....	53
2.4.5. Lipid Peroksidasyonu Tayini .....	53
2.4.6. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesinin Tayini .....	54
2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	55
2.5.1. <i>In vitro</i> Deneysel Çalışma Sonuçlarının İstatistiksel Analizi .....	55
2.5.2. <i>In vivo</i> Deneysel Çalışma Sonuçlarının İstatistiksel Analizi .....	55
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>56</b>
3.1. <i>In vitro</i> Sonuçların Değerlendirilmesi .....	56
3.1.1. Bitkilerin Antioksidant Aktivitesi .....	56
3.1.3. Bitkilerin İndirgeme Gücü .....	63
3.2. <i>In vivo</i> Sonuçların Değerlendirilmesi .....	67
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hepatik Mikrozomal, Hepatik Sitozolik, Böbrek Sitozolik, Akciğer Sitozolik ve Özofagus Sitozolik Hücre Fraksiyonlarının Protein İçeriği .....	70
3.2.2. Antioksidant Enzimler .....	72
3.2.2.1. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitozolünde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi .....	72
3.2.2.2. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitozolünde Katalaz (KAT) Aktivitesi .....	74

3.2.2.3. Deneý hayvanlarının Karacięer Sitozolünde Glutatyon Redüktaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi.....	76
3.2.3. Deneý Hayvanlarının Karacięer Doku Homojenatında Toplam Sülfidril (T-SH), Proteik Olmayan Sülfidril (NP-SH) ve Proteik Bağlı Sülfidril Gruplarının (PB-SH)Tayini .....	78
3.2.4. İlaç Metabolize Eden Enzimler .....	80
3.2.4.1. Faz I Enzimler .....	80
3.2.4.1.1. Deneý Hayvanlarının Karacięer Mikrozomlarında Sitokrom P450 (cyt P450) ve Sitokrom b <sub>5</sub> (cyt b <sub>5</sub> ) İçerięi .....	80
3.2.4.1.2. Deneý Hayvanlarının Karacięer Mikrozomlarında NADPH-Bağımlı Cyt P450 Redüktaz (cyt P450 R) ve NADH-Bağımlı Cyt b <sub>5</sub> Redüktaz (cyt b <sub>5</sub> R) Aktiviteleri .....	82
3.2.4.2. Faz II Enzimler.....	84
3.2.4.2.1. Deneý Hayvanlarının Karacięer, Böbrek, Akcięer ve Özofagus Sitozolünde DT-diafosforaz Aktivitesi .....	84
3.2.4.2.2. Deneý Hayvanlarının Karacięer, Böbrek, Akcięer ve Özofagus Sitozolünde Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi .....	86
3.2.4.3. Deneý Hayvanlarının Karacięer Mikrozomlarında Lipid Peroksidasyon ve Karacięer Sitozolünde Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi.....	88
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>	<b>90</b>
<b>5. ÖNERİLER .....</b>	<b>96</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>97</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>104</b>

**SEMBOL LİSTESİ**

<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>Cyt P450</b>	: Sitokrom P450
<b>PPH</b>	: Polifenoller
<b>ETS</b>	: Elektron Taşıma Sistemi
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon (İndirgenmiş)
<b>GSSG</b>	: Glutasyon (Yükseltgenmiş)
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>NADP<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (yükseltgenmiş)
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (yükseltgenmiş)
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojen (indirgenmiş)
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrojen (indirgenmiş)
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>LPO</b>	: Lipid Peroksidasyon
<b>BHT</b>	: Bütillenmişhidroksitoluen
<b>BHA</b>	: Bütillenmişhidroksianisol
<b>DPPH</b>	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin
<b>DM</b>	: 2,6-di-tertkinonmetid
<b>Cyt b<sub>5</sub></b>	: Sitokrom b <sub>5</sub>
<b>Cyt P450 R</b>	: NADPH-Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz
<b>Cyt b<sub>5</sub> R</b>	: NADH-Bağımlı Sitokrom b <sub>5</sub> Redüktaz
<b>FMN</b>	: Flavin Adenin Mononükleotid
<b>GST</b>	: Glutayon S-Transferaz
<b>DTD</b>	: DT-diafosforaz
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotid
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik Asit
<b>TBA</b>	: 2-tiobarbütirik Asit

## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Antimutajenik ve antikansirojenik fenolik bileşiklerin bazı sınıfları .....	6
<b>Tablo 2.</b> Radikaller, simgeler ve kimlikleri .....	12
<b>Tablo 3.</b> Oksijen molekülü ile oksijen radikallerinde elektron dağılımı .....	14
<b>Tablo 4.</b> Hücrede serbest oksijen radikal endojen ve eksojen kaynakları .....	16
<b>Tablo 5.</b> Antioksidantların hücresel yerleşimlerine göre sınıflandırılması .....	22
<b>Tablo 6.</b> Ksenobiyotiklerin metabolitik reaksiyonları .....	32
<b>Tablo 7.</b> Deney hayvanlarına ait uygulama dozu ve şekli .....	44
<b>Tablo 8.</b> Süperoksit dismutaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	47
<b>Tablo 9.</b> Katalaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı .....	48
<b>Tablo 10.</b> Glutatyon peroksidaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	48
<b>Tablo 11.</b> Glutatyon redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	49
<b>Tablo 12.</b> NADPH-bağımlı cyt P450 redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	51
<b>Tablo 13.</b> NADH-bağımlı-cyt b <sub>5</sub> redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	52
<b>Tablo 14.</b> DT-diafosforaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	52
<b>Tablo 15.</b> Glutatyon S-transferaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	53
<b>Tablo 16.</b> Lipid peroksidasyonu tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	54
<b>Tablo 17.</b> Laktat dehidrogenaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı .....	54
<b>Tablo 18.</b> Bitkilerin antioksidant aktiviteleri ile standart antioksidant maddelerle peroksidasyon düzeylerinin değerlendirilmesi .....	57
<b>Tablo 19.</b> Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivitelerinin 30. saatteki inhibisyon değerleri .....	60
<b>Tablo 20.</b> İki yönlü varyans (ANOVA) analizi sonucu .....	60
<b>Tablo 21.</b> Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri .....	61
<b>Tablo 22.</b> Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin sürelere (saat) bağlı ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri .....	62
<b>Tablo 23.</b> Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivitelerinin indirgeme gücü değerleri .....	63
<b>Tablo 24.</b> Tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonucu .....	65
<b>Tablo 25.</b> Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü değerlerinin ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri .....	66

<b>Tablo 26.</b> Deney hayvanlarının 0. ve 14. gün sonunda vücut ağırlıkları ortalaması .....	67
<b>Tablo 27.</b> Deney hayvanlarının 0. ve 14. gün sonunda karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus ağırlık ortalaması.....	68
<b>Tablo 28.</b> Deney hayvanlarına ait 0. ve 14. gün sonunda vücut ağırlığına bağlı karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus yüzde ağırlık ortalaması .....	69
<b>Tablo 29.</b> Deney hayvanlarının hepatik mikrozomal, hepatik sitozolik, böbrek sitozolik, akciğer sitozolik ve özofagus sitozolik hücre fraksiyonlarının protein içeriği .....	72
<b>Tablo 30.</b> Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde süperoksit dismutaz aktiviteleri .....	74
<b>Tablo 31.</b> Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde katalaz aktiviteleri.....	76
<b>Tablo 32.</b> Deney hayvanlarının karaciğer sitozolünde glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri .....	77
<b>Tablo 33.</b> Deney hayvanlarının karaciğer doku homojenatında toplam sülfidril (T-SH), proteik olmayan sülfidril (NP-SH) ve proteik bağlı sülfidril (PB-SH) grupları .....	79
<b>Tablo 34.</b> Deney hayvanlarının hepatik hücre fraksiyonlarının cyt P450 ve cyt b <sub>5</sub> içeriği .....	80
<b>Tablo 35.</b> Deney hayvanlarının hepatik hücre fraksiyonlarının cyt P450 R ve cyt b <sub>5</sub> R aktivitesi .....	82
<b>Tablo 36.</b> Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolik DT-diafosforaz aktivitesi .....	85
<b>Tablo 37.</b> Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolik glutatyon S-transferaz aktivitesi .....	87
<b>Tablo 38.</b> Deney hayvanlarının karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon ve karaciğer sitozolünde laktat dehidrogenaz aktivitesi .....	88

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Bitkilerdeki aktif bileşiklerin elde edilmesi ve biyokimyasal uygulamalar (1) fraksiyon yöntemi; (2) saflaştırma.....	4
Şekil 2. Tıbbi bitkilerin yaygın kullanımıyla ilgili geçerli farmakolojik yöntemler.....	5
Şekil 3. Flavonol ve flavanollerin yapısı .....	8
Şekil 4. $\beta$ -karotenin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 5. Sitokrom P450 nin monooksijenaz ve peroksidaz döngüsü [Fe:sitokrom P450, RH: substrat, XOOH: peroksit].....	15
Şekil 6. Poli doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu .....	18
Şekil 7. Hidroksil radikallerinin DNA'ya etkileri.....	20
Şekil 8. Hidrofilik antioksidant olan glutatyonun enzimatik olmayan etkisi.....	25
Şekil 9. Hidroperoksitler (ROOH), peroksit radikalleri (ROO $\cdot$ ), organik radikaller (R $\cdot$ ) ve hidroksil radikalleri (HO $\cdot$ ) ile glutatyonun reaksiyonu .....	25
Şekil 10. Lipid peroksidasyonunu ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonu .....	26
Şekil 11. L-Askorbik asit ve L-dehidroksiaskorbik asit .....	26
Şekil 17. $\alpha$ -Tokoferol radikalinin oluşumu.....	27
Şekil 12. BHT'nin farklı türleri.....	28
Şekil 13. BHT'nin yağ ve yağ asitlerinin oksidasyonuna etkisi .....	28
Şekil 14. BHA' nin farklı türleri .....	29
Şekil 15. BHT ve BHA'nın DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) ile meydana gelen reaksiyonları .....	30
Şekil 16. BHA ve BHT'in peroksit radikallerine etkisi .....	30
Şekil 18. Fenilsülfoksitin faz I ve faz II reaksiyonu sonucu oluşumu .....	32
Şekil 19. Mikrozomal elektron-transport sistemi.....	34
Şekil 20. Kinonun DT-diafosforaz tarafından indirgenmesi.....	37
Şekil 21. Piruvat İnsan metabolizması .....	38
Şekil 22. Elman Reaktifi'nin mekanizması .....	49
Şekil 23. Bitkilerin antioksidant aktivitelerinin standart antioksidant maddelerle peroksidasyon düzeylerinin karşılaştırılması .....	58
Şekil 24. Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin 30. saat sonunda inhibisyon düzeylerinin karşılaştırılması .....	59
Şekil 25. Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü karşılaştırma diyagramı.....	64

Şekil 26. Karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus doku ağırlık ortalamasının dağılımı .....	68
Şekil 27. Karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus bağıl doku ağırlık ortalamasının dağılımı .	70
Şekil 28. Dört gruba ait karaciğer mikrozomal (KMP), sitozolik (KSP), böbrek sitozolik (BSP), akciğer sitozolik (ASP) ve özofagus sitozolik (ÖSP) protein içeriklerinin dağılımı .....	71
Şekil 29. Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer özofagus sitozolik süperoksit dismutaz aktivitesinin dağılımı.....	74
Şekil 30. Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer özofagus sitozolik katalaz aktivitesinin dağılımı.....	76
Şekil 31. Dört gruba ait karaciğer sitozolünde glutatyon redüktaz aktivitesinin dağılımı.....	77
Şekil 32. Dört gruba ait karaciğer sitozolünde glutatyon peroksidaz aktivitesinin dağılımı ...	78
Şekil 33. Dört gruba ait karaciğer doku homojenatındaki toplam sülfidril (T-SH), proteik olmayan sülfidril (NP-SH) ve proteik bağlı sülfidril gruplarının (PB-SH) dağılımı .....	80
Şekil 34. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt P450 içeriğinin dağılımı.....	81
Şekil 35. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt b <sub>5</sub> içeriğinin dağılımı.....	82
Şekil 36. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt P450 R aktivitesinin dağılımı.....	83
Şekil 37. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt b <sub>5</sub> R aktivitesinin dağılımı.....	83
Şekil 38. Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde DT-diafosforaz aktivitesinin dağılımı.....	85
Şekil 39. Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde glutatyon S-transferaz aktivitesinin dağılımı .....	87
Şekil 40. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon düzeyi .....	89
Şekil 41. Dört gruba ait karaciğer sitozolünde laktat dehidrogenaz aktivitesinin dağılımı .....	89



# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Tedavi edici olarak doğal ürünlerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Sanayi devrimi ve organik kimyanın gelişimiyle sentetik ürünler farmakolojik tedavinin kaynağı olmuştur. Çünkü saf bileşiklerden, yapısal modifikasyonlarla daha sağlıklı ve güvenli ilaçlar kolaylıkla elde edilebiliyordu. Ayrıca İnsanlığın kültürel gelişimi dışında, doğal ürünlerin kullanımı farklı kültürlerin sağlık ve hastalık değerleri ve dini inançların da önemi vardır. Doğal kaynaklı ilaçlar endüstrilemiş batı toplumların yeni kabulü karşısında düşük geliri ve eğitimsiz toplumların tek alternatifi veya farmakolojik değeri olmayan basit maddeler olarak kabul edildi.

Bununla birlikte, enfeksiyona karşı tedavinin gelişmesinde, mikroorganizmalardan elde edilen penisilinün etkisi düşünülürse, doğal ürünlerin önemi daha iyi anlaşılır. Dünyada yaygın olarak kullanılan ilaçların % 25 i doğal ürünlerden elde edilmektedir ve bu ilaçların 121 tanesinde aktif madde olarak doğal ürünler kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından ilaçların ana kaynağı olarak düşünülen 252 ilacın % 11 i bitkisel orijinli ve doğal ürünlerden elde edilen sentetik ilaçlardır. Bitkilerden elde edilen ilaçlara yüksük otundan (*Digitalis spp.*) digoksin, kınakınadan (*Cinchona spp.*) kinin ve kinidin, cezayirmenekşesinden (*Catharanthus roseus*) vinkristin ve vinblastin, güzelavrat otundan (*Atropa belladonna*) atropin, haşhaştan (*Popaver somniferum*) kodain, morfin örnektir. Enfeksiyona ve tümöre karşı eczanelerde satılan ilaçların % 60 doğal kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. Bu bitkilerden elde edilen doğal maddeler henüz sentezlenememiştir ve hala yabani veya kültür bitkilerden elde edilmektedir. Ayrıca, tamamen bitkilerden elde edilen muskarin, kanabinoidler, forskolin, kolşisin ve forbolesterler gibi bileşikler farmakolojik, fizyolojik ve biyokimyasal çalışmaların önemli kaynaklarıdır.

Uluslararası Kanseri Enstitüsü, anti-HIV aktivitesi için 50.000 ve anti-tümör aktivitesi için 33.000 den fazla bitki örneğini test etti. Fakat yeni ilaç kaynağı olarak yüksek bitkilerin potansiyel olarak kullanımı araştırılmaktadır. Merck, Glaxo, Boehringer ve Syntex gibi büyük ilaç şirketleri doğal ürünlerden yeni ilaç elde etmek için çalışmalarını sürdürmektedirler.

Tahmin edilen 250.000-500.000 bitki türünün, sadece az bir kısmı fotokimyasal özelliği incelendi ve hatta az bir kısmının farmakolojik özellikleri araştırıldı. Bazı bitki türleri için de, başlangıç çalışması veya farmakolojik tarama şeklinde araştırma yapıldı. Ayrıca 5.000 bitkinin medikal kullanımı üzerinde çalışıldığı tahmin edilmektedir.



Bitki orijinli ilaçların belli çerçeve içerisinde değerlendirilmesi önemlidir. Bitkiler değişik alanlarda tedavi kaynakları olarak kullanılabilir. Evde yapılan tedavi veya bitkisel çay olarak kullanılan bitkileri de tıbbi bitkiler olarak düşünülebilir. Bitkiler, sıvı ekstraktı, toz, hap ve kapsül gibi farmakolojik kullanıma hazır zenginleştirilmiş fraksiyonlar halinde veya ham ekstrakt şeklinde bitkisel ilaçlar olarak kullanılabilir. Bitkilerden bir ilaç olarak doğrudan kullanılabilen kinin, digoksin ve ergotamin gibi aktif olan değişik bileşikler izole etmek için saflaştırma ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanabilir. Bir tıbbi bitki; (a) fizyolojik ve patolojik prosesleri değiştirmede, hastalık tedavisinde veya sakinleştirici olarak kullanılabilir, (b) ilaç kaynağı veya başlangıç maddesi olarak değerlendirilir. Bitkilerden (küçük kök, meyve, reçine, yağ) ya farmakolojik hazırlık yapılarak yada ham halde alınarak bir çok ilacın üretimi mümkündür [1].

## 1.2. Bitki Seçimi

Bitki kaynaklarından ilaç geliştirilmesi amaca bağlıdır. Farklı stratejilerle alternatif tıp veya izole edilmiş aktif bileşik ortaya çıkacaktır. Fakat, bu yaklaşımların dışında, bir farmakolojik çalışma için uygun bitkinin seçimi son derece önemli aşamadır. Geleneksel kullanım, kimyasal bileşim, zehir etkisi (toksik), rasgele seçim veya farklı kombinasyonlar gibi değerlendirmelerin yapıldığı farklı aşamalar vardır.

En yaygın olan yöntem, etnofarmakolojik (halk ilaçları) ve etnobotanik olarak bilinen farklı kültürlerdeki doğal kaynakların kullanımının dikkatli gözlenmesidir. Bitkinin etnik toplum tarafından nasıl kullanıldığına dair bilgi son derece önemlidir. Çünkü en iyi ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde yol gösterir. Kullanılan formül şekline göre, bitkinin ağız yoluyla kullanılıp kullanılmaması veya uygulanan doz miktarı gibi kriterler farmakolojik aktiviteleri hakkında bilgi verecektir. Bitki seçiminde etnofarmakolojik yaklaşımı tercih edildiğinde belli kriterler dikkate alınmalıdır. Örneğin, her bir toplumun farklı sağlık sistemleri olduğu kadar kendine ait sağlık ve hastalık yaklaşımı vardır.

Biyolojik araştırma materyali olarak tedavide kullanılan oldukça spesifik ilacın araştırılmasıyla, toksik bitkilerden son derece faydalı bilgiler elde edilebilir. Günümüzde araştırmalarda kullanılan önemli bileşikler toksik bitkilerden elde edilmektedir. Bitkinin bulunduğu ortamın irdelenmesi öncelikle anti-bakterial ve insektisit (böcek öldürücü) ilaçlar olmak üzere, aktif bileşiklerin izolasyonuna yol gösterecektir. Bitki seçiminde diğer bir yöntem de ise, araştırmacı önceden yapılan çalışmaların aktif türlerini değerlendirerek ve en iyi bilinen farmakolojik aktiviteleri araştırarak karar verebilir. Antitümör ilaçların araştırılması bu stratejinin kullanılmasına güzel bir örnektir.

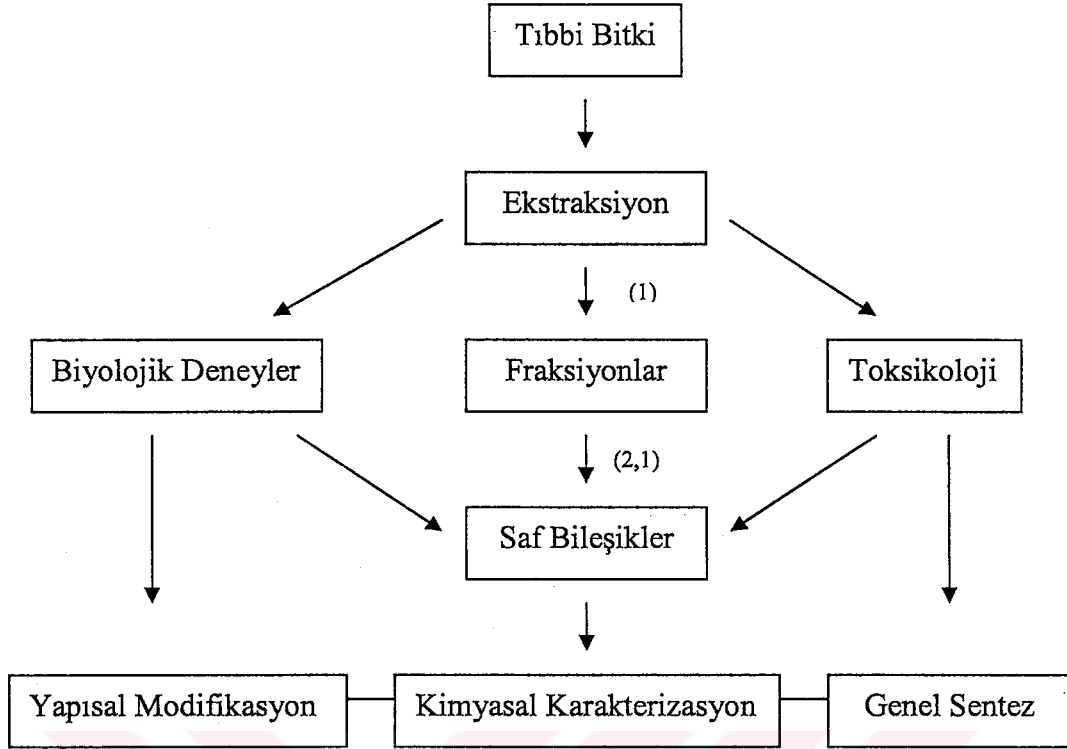
Son olarak, farklı kriterlerin kombinasyonlarını kullanmak mümkündür. Eğer amaç yeni bir kaynak bulmaksa, belirlenen stratejilerin dışında bilimsel literatürler, araştırma verileri veya toksik bileşiklerin önceden tayin edilen aktifliklerinin değerlendirilmesi önemlidir [1].

### 1.3. Bitki Materyallerinin Hazırlanması ve Aktif Bileşiklerin Saflaştırılması

Önce bitki belirlenir, sonra toplanarak bitkiler isimlendirilir ve en sonunda tayin yöntemleri belirlenir. Bitki toplanması profesyonel türleri doğru tanımlayabilen bir botanikçi tarafından yapılması ve kurutulmuş bitki örneklerinin referans materyali olarak değerlendirilmesi önemlidir. Eğer mümkünse, bitkinin toplanma tarihi ve yeri kaydedilmelidir. Genellikle standart yöntem bitki materyalinin gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmasıdır. Ayrıca sıcaklık ve hava kontrollü fırınlar kullanılabilir. Bitki bileşeni bilinmediği zaman, ekstraksiyon, kuru dondurma ve liyofilizasyon gibi standart yöntemler uygulanır.

Kurutulmuş veya kararlı bir hale getirilmiş bitki materyali toz haline getirilir ve uygun ekstraksiyon yöntemi uygulanır. Bitkinin içerdiği bileşiklerin kimyasal yapısı bilindiğinde, ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak saf ve yüksek verimde ürün elde edilir. Bitkinin kimyasal bileşeni bilinmediğinde, ekstraksiyon yönteminde bitkinin halk arasında nasıl kullanıldığı esas alınmalıdır veya polaritesi artan çözücülerle değişik ekstraksiyonlar uygulanmalıdır.

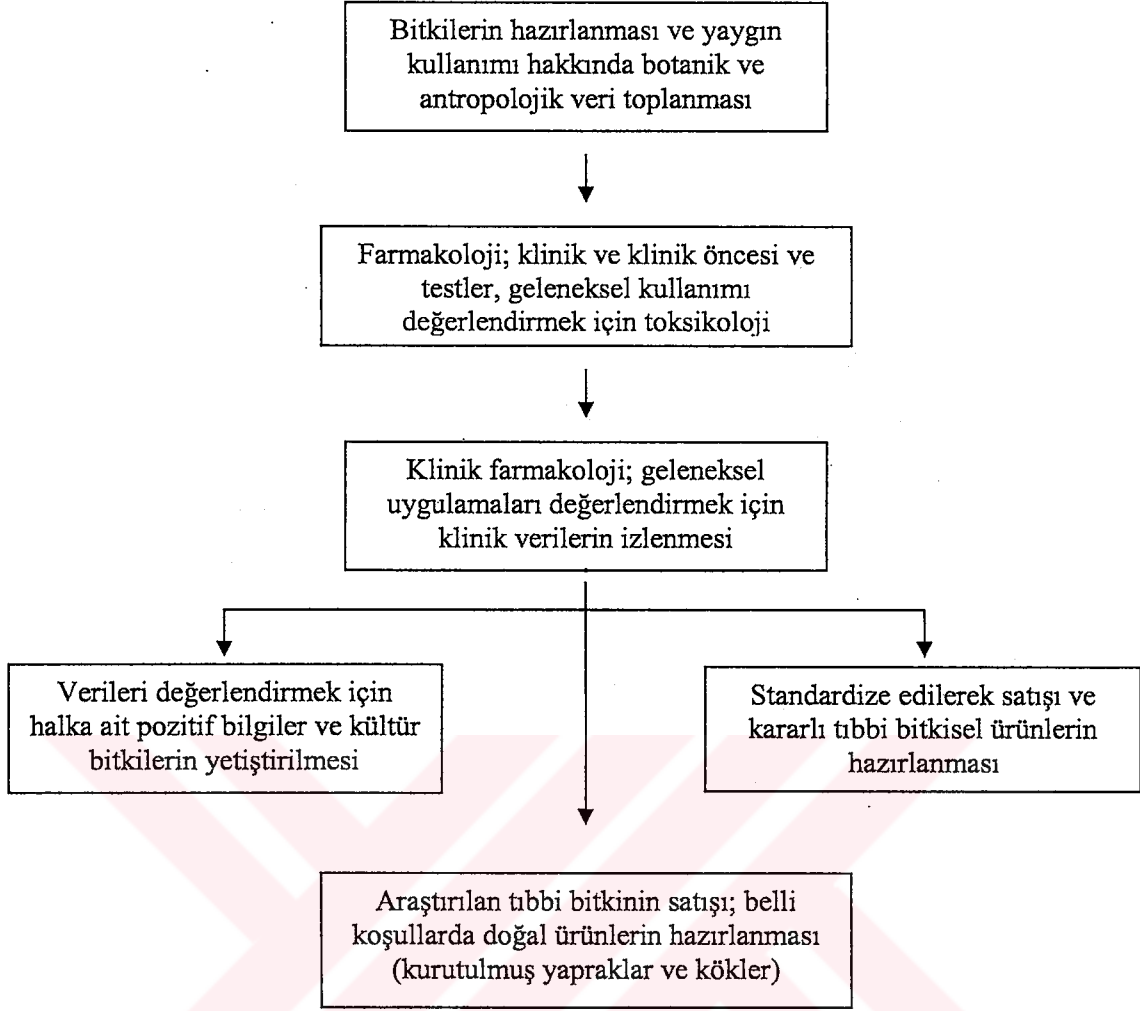
Bitki ekstraktlarından izole edilen aktif bileşiğin tayini için, önce ince tabaka kromatografisi ile kantitatif analiz veya diğer kromatografik yöntemler uygulanır. Ayrıca, ekstraktların biyolojik aktiviteleri genel olarak değerlendirilir veya biyolojik aktivite tayini için takip edilir. Sonuç olarak aktif bitki ekstraktlarının saflaştırılması ve izolasyonu için, fraksiyonlu destilasyon uygulanır. Her bir fraksiyon veya aktif bileşiğin toksik etkisinin tayini için deney hayvanları kullanılarak biyokimyasal deneyler yapılır. Biyolojik deneyler mikroorganizmalar, insektler, hücreye ait sistemler (enzimler, reseptörler v.s.), kültür hücresi (insan ve hayvan) ve in vivo izole edilmiş organlar (memeliler, hem suda hem karada yaşayan hayvan, kuş v.s.) kullanılarak uygulanır. Bütün materyal ve metotların avantajları ve dezavantajları vardır. İlacın geliştirme yönteminde belirlenen bir çok biyolojik çalışmanın her bir aşaması dikkatli bir şekilde seçilmelidir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Bitkilerdeki aktif bileşiklerin elde edilmesi ve biyokimyasal uygulamalar  
(1) fraksiyon yöntemi; (2) saflaştırma

Genelde, bir bitki ekstraktı düşük konsantrasyonda aktif bileşikler ve hassas biyokimyasal deneyler gerektiren miktarı çok düşük gelecekte değişik alanlarda kullanılabilir çeşitli bileşikler içerir. Bundan dolayı, farklı ihtiyaçlarda kullanılabilecek ve doğal ürünlerle ilgili klasik farmakolojik çalışmaları modifiye edilebilen yeni teknikler araştırılmalıdır.

İzole edilen aktif bileşiğin saflığı belirlendikten sonra, yapısı spektrofotometrik yöntemlerle (UV, IR, kütle spektrofotometresi veya NMR) tayin edilir. Kimyasal yapı belirlenmeden önce, türevlerinin kısmı veya tümünün sentezi ve analog türevlerinin hazırlanması düşünülmelidir. Biyolojik aktivite modülasyonu ve yapı-aktivite ilişkisi değerlendirilmelidir. Her bir aşama tanımlandıktan sonra izolasyon ve kısmı veya tümünün sentezi gelecekte tedavide kullanımı düşünülerek toksikolojik, klinik ve klinik öncesi farmakolojik olarak değerlendirilmelidir. Yukarıda bahsedildiği gibi, bu yöntemlerin genel sonucu olarak ilaç pahalıdır. Alternatif tıp veya bitkisel tedavi olarak adlandırılan tıbbi bitkilerin araştırılması tamamlandıktan sonra, bitkilerden elde edilen doğal ve farmakolojik bileşenlerin kullanımına izin verir. Bu yaklaşımda istenen sonucu verebilme yeteneği ve toksikolojik çalışmalarda yapılmalıdır (Şekil 2).



**Şekil 2.** Tıbbi bitkilerin yaygın kullanımıyla ilgili geçerli farmakolojik yöntemler

Doğal bileşiklerin yapısının aydınlatılmasında; karmaşık yapı problemleri, elde edilen bileşiğin fizikokimyasal karakteristikleri ve aktif materyalin veriminin düşük olması gibi zorlukları vardır. Gerçekten bu tür problemler, yanlış negatif sonuçlar, sitotoksik veya spesifik olmayan aktivite sonucu bileşiklerdeki girişim, doğal biyolojik membranlardan zayıf absorplama ve ürünlerin düşük biyolojik aktivitelerinden dolayı başlanan çalışmayı etkileyebilir.

Elde edilen materyal miktarının azlığı geliştirilmiş oldukça duyarlı spesifik biyokimyasal deneyler, modern ekstraksiyon, saflaştırma ve izolasyon yöntemleri kullanılarak artırılabilir. Günümüzde, alkol, tween 80, NaHCO<sub>3</sub>, karboksimetilselüloz, sitrik asit, DMSO, polietilenglikol, propil glikol ve tuz türevleri gibi yardımcı maddeler ekstraksiyon ve izole edilen bileşiği çözüme yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sonuç olarak, bitki türevli ilaçların araştırılması ve tıbbi bitkilerin incelenmesi çok iyi planlanmış strateji, teknik ve finansal destek ve farklı projelerle multidisipliner yaklaşım

gerektirir. Doğal ürünler hakkında bilgiler ve teknolojiadaki avantajlar sadece ilaç geliştirme perspektifinde değerlendirilememelidir. Doğal ürünlerin sağlığa katkısının biyolojik çeşitlilikle anlaşılması özel bir araştırma konusudur [1].

#### 1.4. Bitki Materyallerindeki Antioksidant Bileşikler

##### 1.4.1. Polifenoller

Fenoller (hidroksibenzenler) ve özellikle polifenoller (iki veya daha fazla fenol grupları içeren) bilinen vitaminler ve minerallerin dışında insan ve hayvanların bitkisel yiyeceklerinde bol miktarda bulunur. Bitki metabolitlerinin bu sınıfında basit fenollerden tanenlere kadar değişen geniş aralıkta bilinen 8000 den fazla bileşik mevcuttur (Tablo 1).

**Tablo 1.** Antimutajenik ve antikanserojenik fenolik bileşiklerin bazı sınıfları

Sınıf	İskelet Yapı	Örnek	Temel Kaynağı
Fenolik Asitler	C6-C1	Gallik asit, vanilik asit, tannik asit	Yüksek bitki ve çayırarda
Hidroksisünamik asitler	C6-C3	Ferulik asit, p-kumarik asit, kafeik asit	Yüksek bitkilerde ve bitki hücre duvarı bileşenlerinde
Kumarinler, izokumarinler	C6-C3	Umbelliferone, aeskuletin, skopoletin	
Stilbenler	C6-C2-C6	Resveratrol	Özellikle temel besin olan üzüm
Antrakinonlar	C6-C2-C6		
Flavoidler	C6-C3-C6	Apigenin, genistein, kaempferol, miriketin, rutin, kuerketin	Deniz yosunu ve mantar hariç bütün bitkilerde
Diarilheptanlar	C6-C7-C6	Kurkumin	Kurkumin zerdaçalının sarı rengidir.
Ligninler, neoligninler	(C6-C3) <sub>2</sub>		Keten tohumu
Ligninler	(C6-C3) <sub>n</sub>		Bitki hücre duvarı (lifli yiyecek)

Birçok literatürde fenolik bileşiklerin zararlı etkilerinin protein ve karbonhidratlar gibi makromoleküllere doğrudan bağlanmaları ve çöktürmeleriyle ortaya çıktığı belirtilmektedir. Besin değeri olmayan yiyecekler *in vitro* veya hayvan hücrelerinde antioksidant, anti-inflamantuar, anti-östrojenik, anti-mutagenik ve anti-kanserojenik etkileri göstermelerine rağmen, en son yapılan araştırmalarda polifenollere olan ilgide artma eğilimi olmuştur. Yiyecek katkısı olarak kullanılan polifenolik bileşiklere vanilin, vanilik asit, resveratrol, ellagik asit, kurkumin, gallik asit ve katekin örnek verilebilir [2].

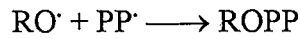
#### 1.4.1.1. Polifenollerin Antioksidant Aktivitesi

Oksidatif etkiye karşı koruma, polifenollerin en etkili özelliklerinden biridir. Polifenollerin, oksidatif DNA hasarına karşı koruması genomik dengesizlik ve kansere karşı korumadan başka, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) peroksidasyona karşı korunmasında ve kalp hastalığında da yararlı olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda belli kanser riskini azalttığı kadar kardiyosküler riski azaltması ile fenolik antioksidantların aşırı tüketimi arasında bir korelasyon olduğu iddia edilmektedir. Polifenollerin antioksidant aktivitesinin esası serbest radikalleri temizleme yeteneği ile açıklamaktadır. Bazı polifenoller örneğin faz II enzimlerinden glutatyon S-transferazı veya örneğin metallothionein antioksidant enzimleri aktive edebilir. Polifenoller sitokrom P450 leri (cyt P450) veya oksidant aktiviteye sahip siklooksigenaz ve lipoksigenaz enzimleri dahi inhibe edebilir.

Mineral kaynaklı bazı polifenoller bazı hastalıklara etki edebilir. Çünkü bakır ve demir iyonları Fenton ve Haber-Wiess reaksiyonlarına göre hidroksil radikallerinin oluşumunu hızlandırabilir. Örneğin, tannik asit demir iyonlarıyla kompleks oluşturarak Fenton reaksiyonuna göre hidroksil radikallerinin oluşumunu inhibe etmektedir. Birçok antioksidant polifenoller (PPH) serbest radikalleri sonuçlandırıcı olarak fonksiyon gösterir ve lipid peroksidasyonunu katalize ederek metal iyonlarıyla şelat oluşturabilir. Böylece, lipidlerin oksidasyonunu engeller.



Oluşan fenoksi radikalleri kararlıdır ve diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek farklı yönlerde sonuçlandırıcı etki gösterir.



Flavonoidler grubu yüksek potansiyelde antioksidant aktivite gösterir. Yapı-aktivite ilişkileri bu grupta oldukça etkilidir. Genellikle, oksidatif strese karşı korumada polifenollerin ve fenollerin etkisi kritik biyomoleküller üzerinden fenoksi radikallerinin aktivitesi veya serbest radikaller üzerinden spesifik aktivitesine bağlıdır [2].

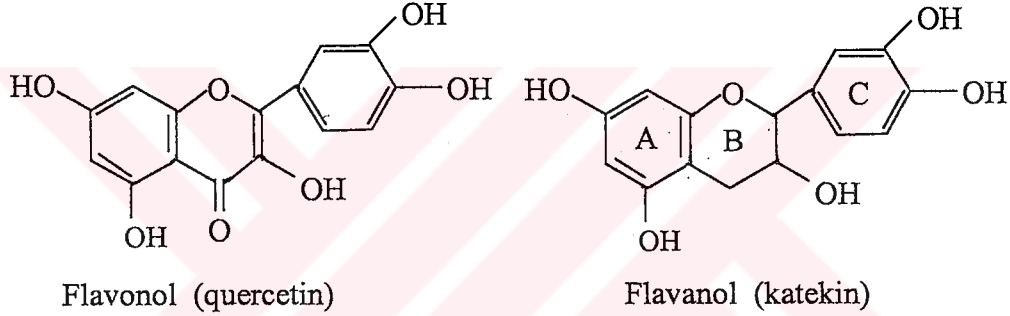
Flavonoidler, süperoksit ve hidroksil radikallerini gidermede, lipid peroksit radikallerini indirgemedede ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmede etkilidir. Flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan katekinler, insan besininin genel bileşeni olarak tanınmaktadır. Ayrıca yeşil çay yapraklarında, nispeten bol miktarda epikatekin, epikatekingallat, epigallokatekin ve epigallokatekingallat bulunmaktadır. Katekinler antimutajenik ve antikanserojenik aktivite gibi biyolojik özelliklere sahiptirler. Bu bileşiklerin antioksidatif etkileri, kansere yol açan proseslerin oksijen radikallerini ve lipid peroksidasyonunu önlemek açısından önemlidir. Yeşil çayın antioksidant ve antikanserojenik etkileri, çay bileşenlerinin



aktif oksijen formları, hidrojen peroksit ve süperoksit karşı gösterdiği antioksidatif aktivite, oksijen radikalleri ve hidrojen peroksidin neden oldukları sitotoksikliği ve hücre kültüründe hücreler arası etkilenmeyi önlemektedir.

Flavonoidlerin yapısında 3-OH, C-2 ve C-3 atomları arasında doymamış bağ ve C-4 pozisyonunda (piran halkasında) karbonil grubunun bulunmasının antioksidant özelliğe olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. C halkasındaki 2,3-çift bağın 4-okso grubuyla konjugasyonu B-halkası elektron delokalizasyonuna katkıda bulunur. A ve C halkasında bulunan C-3 ve C-5 hidroksil grupları ise 4-okso gruplarıyla birlikte maksimum radikal uzaklaştırma etkisi sağlar. B-halkasında bulunan O-hidroksi grubu elektron delokalizasyonuna etki ederek, yüksek kararlılıkta flavonoid radikalinin oluşumuna neden olur.

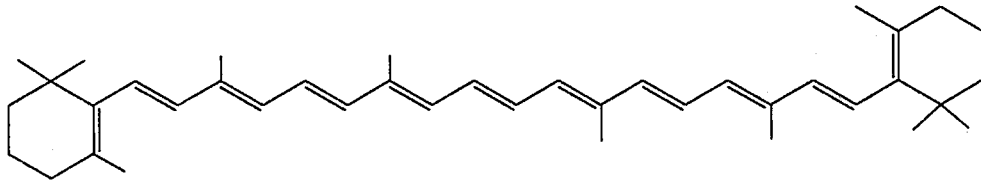
Buna göre flavonollerin (örneğin, quercetin) flavanollerden (örneğin, katekin) daha etkili antioksidant etki gösterir [3,4].



Şekil 3. Flavonol ve flavanollerin yapısı

#### 1.4.2. Karotenoidler

$C_{40}$  terpenoidler olan karotenoidler suda çözünmeyen pigmentlerin son derece yaygın olanıdır. Karotenoid  $\beta$ -karoten hidrasyon ve Vitamin A,  $C_{20}$  izoprenoid alkolün esas kaynağı olduğu için temel besin kaynağıdır. Karotenoidler, bitkilerde çiçek ve meyvelere rengini ve fotosenteze yardımcı pigment olarak iki ana fonksiyonu vardır. Karotenoidler oldukça kompleks yapılı moleküllerdir ve son derece hidroksile olmuş (keto grupları ile), doymamış (allenik veya asetilenik grupları ile), yaygın olarak izopiren uçları ( $C_{45}$  veya  $C_{50}$  karotenoidler) ihtiva eder [5].



$\beta$ -karoten

Şekil 4.  $\beta$ -karotenin kimyasal yapısı

### 1.4.2.1. Karotenoidlerin Antioksidant Aktivitesi

$\beta$ -karoten bitki pigmentlerinden karotenoidlerin bir üyesi olan antioksidant bir moleküldür. Bu özelliği ile süperoksit ve peroksit radikallerini süpürme yeteneği vardır. Özellikle havuçta bol miktarda bulunan izoprenoid yapıya sahip hidrofobik bir moleküldür. Diyetlerinde bol miktarda  $\beta$ -karoten bulunanlarda akciğer ve deri kanseri, kalp hastalığı görülme sıklığı daha azdır.  $\beta$ -karotenin koruyucu etkisi antioksidant özelliğinden ve bağışıklık fonksiyonunu artması gibi etkinliklerinden kaynaklanmaktadır. Diğer memelilerde olduğu gibi insan retinası ışığa hassas iki reseptör hücre ihtiva eder; bunlardan çubukçul şeklinde olanlar (rod cells) zayıf ışığı algırlar ancak hiçbir rengi tanımazlar. Bu hücreler siyah beyaz görmeden sorumludurlar, A vitamini eksikliğinden etkilenirler. Dolayısıyla, etkin bir görme olayı için bu organizmalar A vitaminine ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde A vitamini  $\beta$ -karotenden oksidoredüktazlar tarafından katalizlenen redoks reaksiyonlarıyla sentezlenirler [6].

## 1.5. *In vitro* Çalışmalarda Kullanılan Bitkiler

### 1.5.1. *Origanum vulgare* L. (İstanbul kekiği)

100 cm boyundadır. Gövde üzerinde yaklaşık 12 dal vardır. Yapraklar saplı ya da çok kısa saplı olabilir. Yaprak şekli elips ya da yuvarlaktır. Yapraklarda salgı tüyleri bulunur veya bulunmaz. Çanak yaprak 2-4 mm, taç yapraklar 3-10 mm mor, mavi ya da beyaz renklidir [7]. Kurak tepeler, taşlık sırtlar, ve orman açıklıklarında yetişir. Anadolu'da yaygın bir bitkidir. Memleketimizde dört alt türü (*subsp.gracile*, *subsp.hirtum*, *subsp.viride*, *subsp. vulgare*) yetiştirildiği bilinmektedir. Uçucu yağ (% 0.1-0.2, taze bitkide) taşımaktadır. Terletici, idrar söktürücü ve yatıştırıcı olarak kullanılır. Baharat olarak kullanılmaktadır [8]. Ayrıca flavonoidler [9,10], yağ asitleri [11], glikozidler [12] içermektedir

### 1.5.2. *Thymus leucotrichus* L. (Kekik)

Bodur çalı şeklinde bir bitkidir. Yapraklar 4-9.5 mm dir. Yapraklar uzun tüylüdür ve genellikle yağ kanalları vardır. Kenarları kıvrıktır. Çanak yapraklarda yağ kanalları bulunur ve 3.5-5.2 mm dir. Taç yapraklar mor renkli ve 6-8 mm dir [7]. Bileşiminde uçucu yağ bulunur. Antiseptik, uyarıcı ve baharat olarak kullanılmaktadır [8].

### 1.5.3. *Origanum laevigatum* L. (Mercan köşk)

70 cm boyunda çalimsı bir bitkidir. Gövde üzerinde yaklaşık 12 dal vardır. Yapraklar saplı ya da sapsızdır. 3-30 mm dir. Çanak yapraklar 3-6 mm, taç yapraklar ise 8-16 mm ve mor renklidir [7]. Anadolu'da 20 kadar *Origanum* türünden biri *Origanum laevigatum* L. dir.



Tedavi edici ve baharat olarak kullanılmaktadır [8]. Ayrıca bileşiminde, yağ asitleri [13] içermektedir.

#### 1.5.4. *Ocimum basilicum* L. (Reyhan otu)

Gövde dallanmış olup 1 m kadardır. Yapraklar 25-70 mm, kenarları dişli, uzun saplı ve salgı tüyleri bakımından zengindir. Çiçek ve yapraklar mor renklidir. Çiçek sayısı 6 tanedir. Çanak yaprak 3-4, taç yaprak 7-8 mm ve pembe renklidir [7]. Kaynağı Hindistan olmakla beraber, bugün bütün Akdeniz bölgesi ülkelerinde ve Türkiye’de yetiştirilmektedir. Bileşiminde uçucu yağ (% 0.2-0.4) taşımaktadır. Uçucu yağ içerisinde estragol, ögenol, sineol v.s. bulunur. Bitki yatıştırıcı, idrar artırıcı ve gaz söktürücü etkilere sahiptir. Baharat olarak ta kullanılmaktadır [8]. Ayrıca yağ asitleri içermektedir [14,15].

#### 1.5.5. *Mentha spicata* L. (Kıvırcık nane)

Tatlı kokulu 30-100 cm boyunda bitkidir. Yapraklar 30-75 mm ve genelde sapsızdır. Yaprakların taban kısmı kalp şeklindedir. Taç yapraklar beyaz, pembe veya leylak renklidir. Meyveler kestane renklidir. Yaprak ve meyveler tüylü veya tüysüz olabilir [7]. Kuzey-Batı Anadolu’da bulunur. Tohum vermediği için ancak rizomları ile üretilebilir. Bileşiminde, reçine, tanen ve uçucu yağ (% 0.5-1) taşımaktadır. Uçucu yağ içinde terpenler, serbest ve ester halinde mentol (% 40-60), menton (% 8-10) ve mentofuran bulunmaktadır. Özellikle sinirsel kökenli mide bulantılarını kesici, gaz söktürücü ve koku verici olarak kullanılmaktadır [8]. Ayrıca bileşiminde, yağ asitleri [16,17], flavonoidler [18] flavon ve glikozidler [19] içermektedir.

#### 1.5.6. *Urtica dioica* L. (Isırgan otu)

30-150 cm uzunlukta bir bitkidir. Yaprakların kenarları dişli ve 4-11 cm dir. Erkek ve dişi çiçekler benzer şekilde, çok dallanmış ve 8 cm dir [7]. Bileşiminde potasyum tuzları, organik asitler, histamin, asetilkolin, vitamin C bulunmaktadır. Yaprak ve kök kan temizleyici, idrar artırıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır. Taze bitki, romatizma ağrılarını gidermek için, ağrıyan yerlere sürülerek tahriş yapılır ve kan toplanması sağlanır. Bitkiden elde edilen bazı fraksiyonların antikoagülan bir etkiye sahip bulunduğu göstermiştir [8]. Ayrıca aminoasitler, yağ asitleri taninler [20], flavonal glikozidler [21], proteinler [22], glikopiranoidler [23] içermektedir.

### 1.5.7. *Urtica pilulifera* L. (Karaisırgan otu)

30-77 cm uzunlukta bitkilerdir. Yaprak kenarları dişlidir. Erkek çiçekler, üst üste binmiş durumdadır. Dişi çiçekler ise yuvarlaktır. Bir yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları dişli ve kenarları saplıdır. Meyveleri 3 mm kadar uzunlukta, yumurta biçiminde, parlak ve esmer renkli ve keten tohumuna benzer taneler halindedir [7]. Türkiye’de oldukça yaygın bitkidir. Yol ve duvar kenarlarında yetişir. Sabit yağ ve müsilaj taşımaktadır. Romatizma ağrılarını dindirici, idrar artırıcı, müshil, adet söktürücü, kurt, ateş düşürücü ve cinsel gücü artırıcı özelliği bulunmaktadır [8].

### 1.5.8. *Satureja hortensis* L. (Geyik otu)

Çok dallı gövdeli 10-35 cm boyunda bitkilerdir. Yapraklar kısa saplı 8-30 mm dir. Çiçekler birbirinden oldukça uzaktır. Çanak yapraklar 3-4.5 mm dir. Taç yapraklar leylak rengi, mor veya beyaz olup 4-10 mm dir. Meyve 1-1.2 mm dir [7]. Uçucu yağda fenol türevi bileşikler bulunmaktadır. Gaz söktürücü, terletici, iştah açıcı, idrar artırıcı, uyarıcı ve cinsel gücü artırıcı etkileri vardır [8]. Ayrıca bileşiminde, yağ asitleri [24,25,26] içermektedir.

### 1.5.9. *Viscum album* L. (Ökse otu)

Gövde dallanmış olup 80 cm dir. Yapraklar 2.2-8 cm dir. Yaprak 5 elemanlıdır. Çiçekler 3-5 tane ve sapsızdır. Erkek çiçek yaprakları 4-5 mm ve sivri uçlu, dişi çiçek yaprakları 0.5-0.75 mm ve sivri uçludur. Meyve 1 cm olup yuvarlak, beyaz ya da sarı renklidir [7]. Ağaçlar üzerinde parazit olarak yaşar. Kışın yapraklarını dökmez. Taze meyveler bezelye büyüklüğünde ve parlak beyaz renklidir. Yapışkan bir madde taşır. Bitki reçine, saponinler, organik asitler ve alkaloidler taşımaktadır. Meyve ve yapraklı dallar kabız, idrar artırıcı, kusturucu, kuvvet verici ve tansiyon düşürücü etkileri vardır [8]. Ayrıca bileşiminde, fenolik bileşikler [27], polifenolik bileşikler, oligosakkaritler, alkaloidler, peptitler [28] içermektedir.

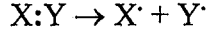
### 1.5.10. *Hypericum venustum* Fenzl. (Binbirdelik otu)

Gövde 25-75 cm, kökleri oldukça fazla dallanmış ve tüsüzdür. Yapraklar 13-32 mm arasında tüsüz olup kenarlarında salgı bezi yoktur. Çiçek sayısı çok sayıda olup piramit yada silindirik şeklindedir. Yaprak çanak, sivri yada küt uçludur. Kenarları dişli yada siyah salgı tüylüdür. Taç yaprakları 10-14 cm boyutundadır. Meyvesi kapsül şeklindedir. 5-6 mm boyutunda ve oval şekillidir. Nemli yerlerde bulunur [7]. İçeriği ve etkin özellikleri hakkında bilgi yoktur.

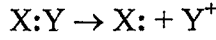
### 1.6. Biyolojik Sistemlerde Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir [29].

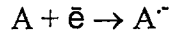
1. Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün hidrolitik bölünmesi; hidrolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan elektronlar her iki atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikal değil, iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi,



Orbitalinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan halojen atomları (Cl ve Br), hidrojen atomu, Na ve K gibi alkali metal atomları ve oksijenin indirgenme ara ürünleri olan süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil ( $OH\cdot$ ) gibi bağımsız kısa ömürlü reaktif türler serbest radikal olarak tanımlanmaktadır [30]. Bilinen başlıca radikal türleri Tablo 2 de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Radikaller, simgeler ve kimlikleri

Radikal	Simge	Kimlik
Hidrojen	$H\cdot$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	$OH\cdot$	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	$O_2$	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	$HO_2\cdot$	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksit radikal	$ROO\cdot$	Perhidroksit daha zayıf etkili lipidlere lokalize olur
Triklorometil	$CCl_3$	$CCl_4$ metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Tiol radikali	$RS\cdot$	Sülfürlü ve eşleşmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	$RO\cdot$	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monooksit	$NO$	L-arjinin amino asitinden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	$NO_2$	$NO$ 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

O<sub>2</sub>, solunum yapan canlı organizmalar için hayati bir madde olmasına rağmen çeşitli toksik türevler oluşturması bakımından önemlidir. Havanın yaklaşık % 20 si oksijendir. Bir oksijen atmosferi, hava yerine saf oksijen kullanılarak elde edilebilir. Daha yüksek oksijen konsantrasyonu hava veya oksijen ile atmosferik basınçtan daha yüksek basınçlar altında elde edilebilir ki 0.2 atmosferden daha yüksek oksijen basıncı aerobik organizmalar için bile toksiktir. Normal şartlarda doğada ulaşılmamasına rağmen laboratuarda uygun ortam sağlanabilir. Oksijen normal basınçta bile bazı organizmalarda toksik etki gösterir.

Moleküler oksijenin dış orbital elektronlarının ikisinin çiftleşmemiş olmasından dolayı diatomik elementler içerisinde önemlidir. Bu eşleşmemiş elektronlardan dolayı oksijen yüksek indirgenme potansiyeline sahip olup güçlü bir antioksidandır. Bununla birlikte, iki elektron farklı orbitallerde bulunurlar ve paralel spinlere sahiptirler. Fakat, diğer pek çok moleküllerde antiparalel spinler söz konusudur. Eğer en dıştaki elektronların spinleri aynı ise moleküller arası reaksiyonlar oldukça hızlı meydana geldiğinden moleküler oksijen pek çok durumda doğrudan reaktif olmayıp aktifleştirilmelidir. Örneğin, solunum zincirinde demir (II) iyonları oksijenle kolayca reaksiyona giremez.

Oksijenin en bilinen türü temel haldeki triplet oksijendir ve <sup>3</sup>O<sub>2</sub> olarak gösterilir (Tablo 3). Ayrıca hidrojen peroksit, hipokloroz asidi, ozon ve singlet oksijen radikal olmayan reaktif oksijen türleridir. Singlet oksijen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, oksijenin daha yüksek enerjili bir halidir. En dıştaki eşleşmemiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitalde antiparalel spinler halinde bulduklarında oluşurlar. Oksijenin bu hali oldukça reaktiftir ve canlı organizmalara hasar veren esas oksijen türlerinden biridir. Triplet oksijenin singlet oksijene dönüşmesi için ilave elektrona ihtiyaç yoktur. Fakat, elektronlardan birinin spinini değiştirilmesi için enerji gerekir. Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal olarak üretilebilir ve bu yapıya benzer bileşenler atmosferik bir kirleticidir. Bu form ya kendiliğinden ya da bazı özel sistemleri yoluyla biyokimyasal olarak da üretilebilir. Singlet oksijenin üretildiği en bilinen yol triplet oksijenin görünür ışıkla olan reaksiyonudur. Diğer bir önemli yol ise, organizmalarda laktoperoksidaz ve miyeloperoksidaz enzim sistemleri tarafından gerçekleştirilmesidir. Bu sistemler sütte, tükürükte ve fagosit adı verilen vücuda giren mikroorganizmaları parçalayan hücrelerde bulunurlar. Bir fagositik hücre mikrobiyal bir hücre ile karşılaştığında peroksidaz sistemi aktiflenir ve singlet oksijen üretir. Singlet oksijenin yüksek toksitesinden dolayı, fagositik hücreler de organizmaları öldürür. Peroksidaz sistemlerinde, klorür iyonu hipoklorite (OCI) dönüştürülür ve bu da hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek singlet oksijen üretir. Singlet oksijenin yüksek reaktif olmasından dolayı biyolojik sistemlerde plazma membranında bulunan fosfolipidler gibi çeşitli hayati hücre bileşenlerinin oksidatif parçalanmasına yol açacak

şekilde ok çeşitli kontrol edilemeyen ve istenmeyen oksidatif reaksiyonları meydana gelebilir [31].

**Tablo 3.** Oksijen molekülü ile oksijen radikallerinde elektron dağılımı

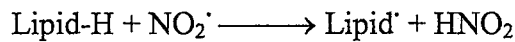
Spin Hali	Triplet Oksijen $^3\text{O}_2$	Singlet Oksijen $^1\text{O}_2$	Süperoksit $\text{O}_2^-$	Peroksit iyonu $\text{O}_2^{2-}$	Singlet Oksijen $^1\text{O}_2$
$\sigma^* 2p$	○	○	○	○	○
$\pi^* 2p$	↑	↑	↑	↑	↑
$\pi 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 1p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 1p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓

### 1.6.1. Serbest Radikallerin Kaynakları

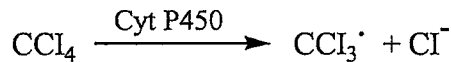
Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında meydana gelebildiği gibi organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Tablo 4) [32].

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da antioksidant aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanır.

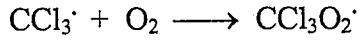
1. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot oksit radikali ( $\text{NO}_2$ ) gazıdır. Bu radikal lipid peroksidasyonu iyi bir başlatıcısıdır.



2. Sağlığa zararlı madde serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin, sağlığa zararlı bir madde olan karbontetraklorür, karaciğerde cyt P450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür.



Bu radikalin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksit radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır.

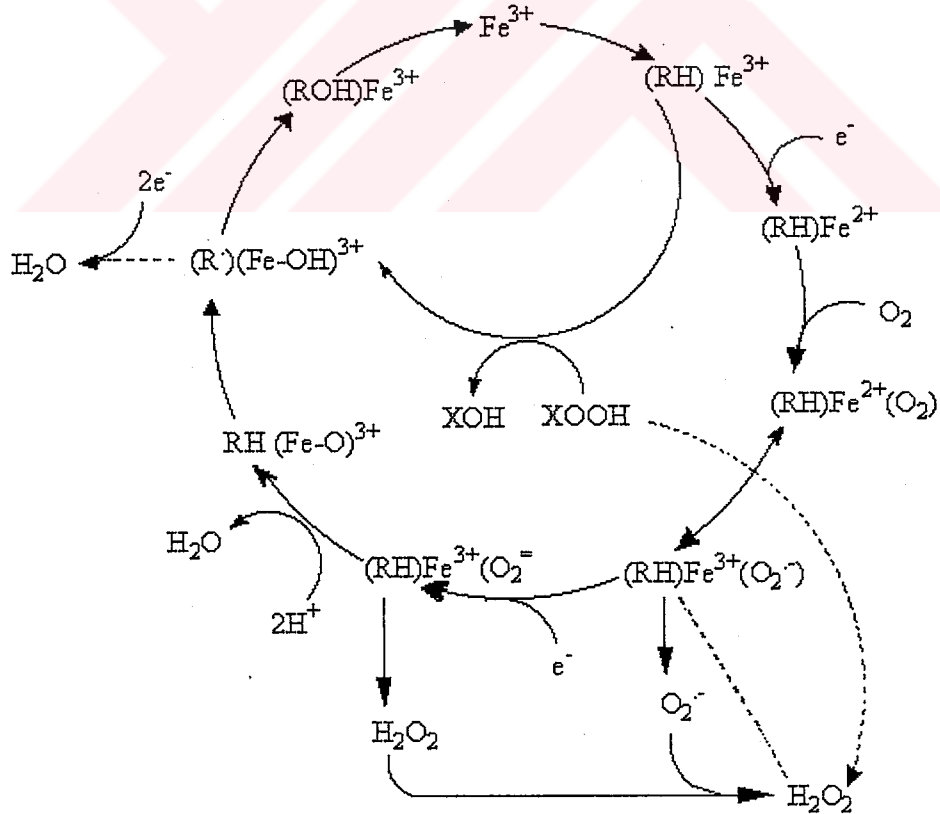


Böylece, reaktif serbest radikal üretimi karaciğerde antioksidant savunma sistemlerini aşar.

3. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgenikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece aşırı miktarda süperoksit üretilmiş olur. Diabetik bir ajan olan alloxan da paraquat gibi etki eder.

4. Toksin, antioksidant aktiviteyi düşürür. Örneğin, parasetamolün karaciğerde sitokrom P450 tarafından metabolizması sonucu glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana gelir.

Bir hem proteini olan sitokrom P450, birçok endojen bileşiğin ve ksenobiyotiğin hidroksilasyonunu katalizler. Bu reaksiyonlarda oksijen kaynağı olarak moleküler oksijeni kullandığı gibi peroksitleri (ROOH) da kullanabilir. Böylece birçok peroksidaz gibi etki eder. Ancak alkol ve asetonla indüksiyonunda olduğu gibi bazı hallerde, sitokrom P450 aşırı miktarda süperoksit üreten enzime dönüşür (Şekil 5) [29].



Şekil 5. Sitokrom P450 nin monooksijenaz ve peroksidaz döngüsü [Fe:sitokrom P450, RH: substrat, XOOH: peroksit]



**Tablo 4.** Hücrede serbest oksijen radikal endojen ve eksojen kaynakları

<b>Endojen Kaynaklar</b>	
Mitokondrial ETS*	
Mikrozomal ETS*	
Kloroplast ETS*	
Oksitleyici enzimler	Ksantin Oksidaz İndolamin dioksijenaz Triptofan dioksijenaz Galaktoz oksidaz Siklooksijenaz Lipooksijenaz Monoaminooksidaz
Fagositik hücreler	Nötrofiller Monosit ve makrofajlar Eozinofiller Endotelial hücreler
<b>Eksojen Kaynaklar</b>	
Diyetsel	Doymamış yağ asitleri ve hayvansal proteinler bakımından zengin, sebze ve meyve bakımından fakir beslenme Şişmanlık Aşırı demir ve bakır alımı Gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması Alkol
Çevresel	İyonize edici radyasyon Hava kirliliği Sigara Asbest ve pestisitler gibi kirleticiler Güneş ışığı Isı şoku Stres
İlaçlar	Glutatyon tüketen ilaçlar

\*ETS : Elektron Taşıma Sistemi

### 1.6.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikal hasarları, hücreyi oluşturan organellerle ve bu organellerin supramoleküller yapılarının içerdiği moleküler bileşiklerle ilişkilidir. Bu organeller ve yapı sitozol içerisindeki mitokondriler, lizozomlar, peroksizomlar, nükleus, endoplazmik retikulum ve plazma membranıdır. Bunların tamamı membranlı yapılardır ve hücrenin metabolik fonksiyonları için gerekli elemanlardır. Bu membranlı yapıların en temel bileşikleri proteinler, lipidler ve düşük oranda karbonhidratlardır. Serbest radikal hasarları; çapraz bağlanmalar, denatürasyon ve inaktivasyonla en son noktaya ulaşır. Serbest radikal molekülleri bu membranlar ile etkileştikleri zaman, lipid peroksidasyonuna neden olurlar ve membran yıkımına yol açarlar [31].

#### 1.6.2.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarını aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin büyük bir kısmı serbest radikaller tarafından etkilenir, fakat lipidler en hassas olanıdır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poli doymamış yağ asitlerinin (Poly unsaturated fatty acid-PUFA) oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

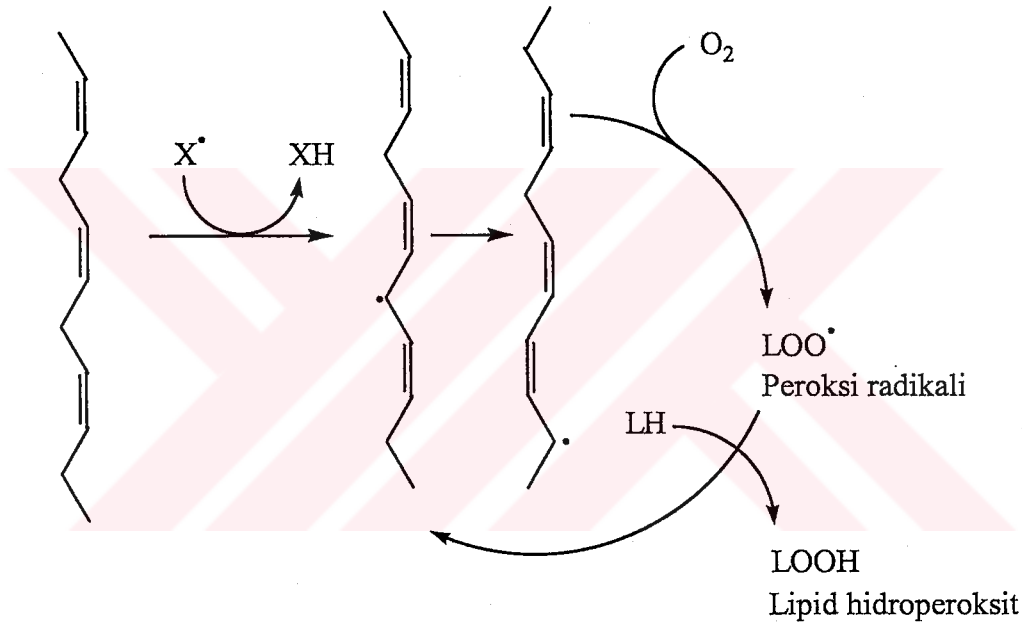
Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poli doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaşması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poli doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek zincir reaksiyonları şeklinde devam eder (Şekil 6).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığı zaman çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitirik asitle ölçülebilen



malondialdehit meydana gelir. Malondialdehit, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyon derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonlarının çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerisasyonuna sebep olur. Bunun sonucu deformasyon, iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi farklı şekillerde membran özelliklerini değiştirir [29].



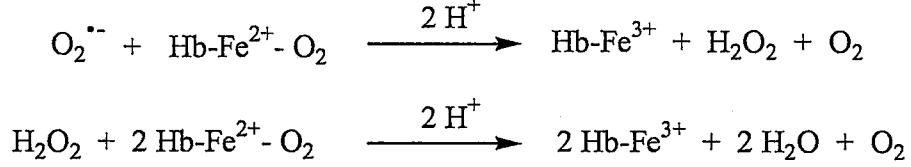
Şekil 6. Poli doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu

#### 1.6.2.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikaller reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobülin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Nitekim, serum proteinlerinde, kataraklı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin eklem sıvılarındaki immünglobülin G'lerin de serbest radikal hasarı tespit edilmiştir. Ayrıca serbest radikallerle muamele edilen immünglobülin G'lerin romatoid faktör antikorları ile bağlanmalarının arttığı

görülmüştür. Böylece daha fazla immün kompleks oluştururlar ki bunlar daha fazla radikal üretirler. Serbest radikal ve immün kompleks oluşumu arasındaki bu karşılıklı etkileşme, romatoid artritteki inflamasyonun bazı özelliklerini kısmen açıklar.

“Hem” proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2^-$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşmasına sebep olur [29].

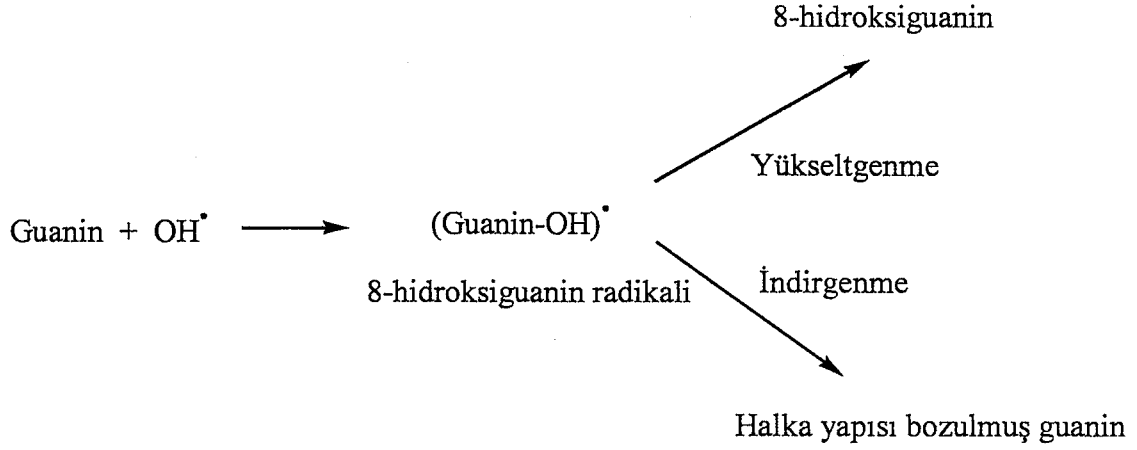


### 1.6.2.3. Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA' yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksite, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötröfillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre modifikasyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli hedefdir. Süperoksit maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterir ki bu oldukça önemli bir etkidir.

Serbest radikaller kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin, diğer safhalarda ise nispeten azdır. Serbest radikal sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma ve onkogenlerde aktivasyon meydana gelir. Süperoksit üretimi özellikle mitokondride daha fazla olduğundan mitokondrial DNA daha fazla hasar görür.

DNA yakınlarında sentezlenen hidroksil radikalleri pürin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyona sebep olur. Oksidatif stresten en çok etkilenen bazlar DNA daki guanin ve sitozindir. Deoksiguanozindeki 8 numaralı karbona bir oksijen atomu bağlanması 8-hidroksiguanozin oluşturur. Bu bileşik fizyolojik pH da 8-oksoguanozine dönüşür ki bu da DNA da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyona sebep olur. Aynı şekilde oksidatif şartlarda deoksisitozinden 5-hidroksisitozin meydana gelir (Şekil 7) [29].



**Şekil 7.** Hidroksil radikallerinin DNA'ya etkileri

#### 1.6.2.4. Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patojenik proseslerde önemli rol oynarlar.

Hücrede karbonhidratlar üzerine serbest oksijen radikallerin etkisi çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır. Özellikle glikoz, mannitol ve bazı sakkarit türevleri, hidroksil radikalleri ile reaksiyon verirler. Monosakkaritlerin yükseltgenmesi ile oluşan çeşitli peroksit türevleri ve oksialdehitler, protein ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllerle etkileşerek ve bu moleküller üzerinde çapraz bağlar oluşturarak bu moleküllerin yapısını bozabilmektedir. Böylece oluşacak hasar hücre yaşlanması veya kanserle sonuçlanabilmektedir [29].

#### 1.7. Antioksidant Enzimler

Dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller serbest radikal olarak, enzimatik ve enzimatik olmayan yapılardan oluşan radikalleri ve reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddeler ise antioksidant olarak tanımlanmaktadır [33].

Normal metabolik reaksiyonlar sırasında, serbest radikallerin endojen ortaya çıkmaları nedeniyle, tüm aerobik organizmalar doku hasarından korunmak için antioksidant savunma mekanizmalarını geliştirmişlerdir. Antioksidantlar, okside edilebilir substrata oranla daha düşük konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktiren, engelleyen maddelerdir. Fizyolojik koşullarda, organizmada oksidant etkenler ve antioksidant mekanizmalar bir denge halinde bulunmaktadır. Bu dengenin oksidantlar lehine değişmesi ile oksidatif stres olarak adlandırılan ileri doku hasarı oluşmaktadır.

Antioksidantların, oksidatif sürecin değişik aşamalarında beş değişik mekanizma ile oldukları savunulmaktadır. Bu mekanizmalar;

1. Lokal oksijenin konsantrasyonunu azaltarak,
2.  $O_2^-$ ,  $HO\cdot$  gibi anahtar reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak yoluyla zincir reaksiyonunun başlamasını engellemek,
3. Peroksitleri parçalayarak onların zincir reaksiyonu oluşturan radikallerle dönüşümünü engellemek,
4. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak, radikal oluşumunun başlamasını engellemek,
5. Başlamış olan bir radikal zincir reaksiyonunu kırmak.

Bu mekanizmalardan ilk ikisi ile işlev gören antioksidantlar, birincil savunma hattını oluşturmaktadır. Enzim olmaları nedeniyle, normal koşullarda antioksidant görevleri bitince değişmeden ortamda kalırlar. Son üç mekanizma ile işlev gören antioksidantlar ise ikincil savunma hattını oluşturmaktadır (Tablo 5) [34].

Radikal metabolitler, aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve bir çok organizmanın antibakteriyel savunmasında önemlidir. Ancak radikal reaksiyonlarını kontrol ederek belli bir düzeyin üstüne çıkmasını engelleyen antioksidant unsurlar bulunmaktadır. Canlılar radikal atakları ile karşılaştıklarında bu gelişmeyi nötralize edecek antioksidant bileşenlerin kapasitesi aşılırsa, geri dönüşümsüz bir tahribata maruz kalır. Bugün pek çok serbest radikal tür ve antioksidant madde ilgili ortama ilişkin önemli biyokimyasal işaretler olarak araştırılmaktadır [32].

**Tablo 5.** Antioksidantların hücrel yerleşimlerine göre sınıflandırılması

Antioksidantlar	İşlev
<b>İntraselüler Antioksidantlar</b>	
SOD (Cu, Zn, Mn)*	O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> 'i katalitik olarak uzaklaştırmak
Katalaz	Yüksek konsantrasyonlarda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i uzaklaştırmak
Glutasyon peroksidaz (Se)*	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve organik hidroperoksitleri uzaklaştırmak
Sitokrom oksidaz (Cu)*	Mitokondride O <sub>2</sub> 'in H <sub>2</sub> O'ya indirgenmesi sırasında reaktif oksijen türlerinin salınımını engellemek
<b>Membrandaki Antioksidantlar</b>	
E vitamini	Yağda çözünen, zincir kıran antioksidant
β-karoten	Yağda çözünen, radikal ve singlet oksijen yakalayıcısı
Koenzim Q	Radikal yakalayıcısı
Membran yapısı	Fosfolipid/kolesterol oranını oluşturması
<b>Ekstraselüler Antioksidantlar</b>	
Transferin	Ferrik iyonları bağlama (1 mol Fe <sup>3+</sup> bağlar)
Laktoferrin	Düşük pH değerlerinde ferrik iyonları bağlama
Haptoglobin	Hemoglobini bağlama
Albümin	Cu ve hemi bağlama, HOCl'i yakalama
SOD	O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> 'i katalitik olarak uzaklaştırma
GSHPx	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i ve hidroperoksitleri uzaklaştırma
Bilirubin	Peroksit radikallerini yakalama
Ürik asit	Radikal yakalama ve metal bağlama
Glukoz	HO• yakalama
Askorbik asit	HO•'i yakalama
Eritrosit	O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> 'i ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'i yakalama

\*Aktif merkezde metal iyonu

### 1.7.1. Süperoksit Dismutaz (E.C. 1.15.1.1)

Süperoksit dismutazlar süperoksitin tek elektronu uzaklaştırarak hidrojen peroksit ve oksijen oluşumunu katalizler.

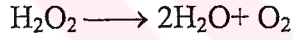


Fizyolojik pH da süperoksidin enzimatik olmayan dismutasyon oranı önemlidir. Çünkü süperoksit dismutazın varlığında dismutasyonu artırmaktadır. Süperoksitlerin turnover sayısı

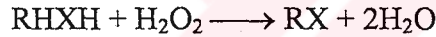
geniş pH aralığında oldukça yüksektir. Dinükleer Cu, Zn veya mononükleer Fe, Mn veya Ni kofaktörleri içeren süperoksit dismutazın dört farklı yapısı tanımlanmıştır. Diğer süperoksit dismutazlardan farklı olarak Fe-SOD ve Mn-SOD in aktif uçlarında yapısal dizilişi ve üç boyutlu yapısı metalik şelat uçlarında benzerlik göstermesidir. İnsanda sitozolik Cu/Zn-SOD, mitokondrial Mn-SOD ve hücre dışı SOD olmak üzere üç farklı süperoksit dismutaz bulunmaktadır. Mn-SOD sadece bakterilerin mitokondrial matriksinde olmasına karşın Cu/Zn-SOD hayvan hücrelerinin sitozolik ve mitokondrial matriksinde bulunmaktadır. Hücre içi SOD konsantrasyonu  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M arasında olduğundan süperoksit oldukça toksiktir [35].

### 1.7.2. Katalaz (E.C. 1.11.1.6)

Katalaz peroksizomlarda hidrojen peroksidi parçalayan yüksek molekül ağırlıklı porfirin içeren bir enzimdir. Hücre içi oksidatif reaksiyonlar moleküler oksijeni hidrojen perokside dönüştürür. Katalaz bütün makromolekülleri peroksitlerin yıkıcı etkisinden korumaktadır.



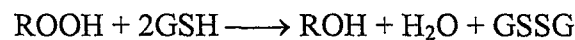
Ayrıca katalaz düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda örneğin askorbik asit, fenoller ve alkoller gibi kosubstratları indirgemedi peroksidaz olarak reaksiyon verebilir.



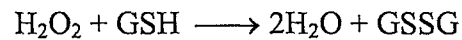
Mememeli hücrelerinde, NADPH katalaza bağlıdır ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in inaktivasyon etkisinden katalazı koruyabilir. Tek hücrelilerde, katalazın antioksidant fonksiyonu oldukça aktiftir. Fakat birçok memeli hücrelerinde, hidrojen peroksidin etkin-stabil konsantrasyonu  $10^{-4}$  M dan fazla olduğu peroksizomlarda katalaz etkindir. Non-peroksizomal katalazın yüksek olduğu eritrositlerde bile, hidrojen peroksit glutatyon peroksit tarafından parçalanır. Bu hidrojen peroksit için katalazın  $K_m$  (1.0 M) değerinin yüksek olmasının nedenidir [35].

### 1.7.3. Glutatyon Peroksidaz (E.C. 1.11.1.9)

Memeli hücrelerde, glutatyon peroksidaz GSH in yükseltgenerek hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen seleno enzimdir. Organik hidroperoksitlerin alkole indirgenmesine karşın hidrojen peroksit suya indirgenir.



veya



Hidroperoksitlerin indirgenmesinde sülfür yerine selenyum kullanmasının avantajı glutatyon peroksidin aktif ucunun doğrudan mutaratasyon göstermesidir. Selenyum-glutatyon

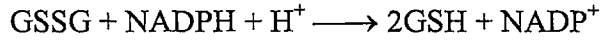
peroksidazın sülfür-glutasyon peroksidaz mutanıtı son derece zayıf glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterir ve kataliz sırasında hızla inaktif olur.

Hidrojen peroksit ve diğer hidrofilik hidroperoksitler, sitozol ve mitokondride bolca bulunan suda çözülebilir selenyum glutasyon peroksidaz (Se-GPx) homotetramerik enzim tarafından indirgenir.

Bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> özellikle askorbat peroksidaz tarafından detoksifiye olduğundan bitki hücrelerinde selenyuma bağlı glutasyon peroksidazlar yoktur [35].

#### 1.7.4. Glutasyon Redüktaz (E.C. 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz sitozol ve mitokondride yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG) NADPH veya NADH ile indirgenmiş glutasyona (GSH) indirgenmesini katalizler.



Birçok antioksidant mekanizmalar GSSG veya NADP<sup>+</sup> oluşumunda birleşir. Örneğin gluteredoksin enzimi GSH oluşumunda dehidroksiaskorbattan (A) tekrar askorbat (AH<sup>-</sup>) meydana gelir [35].

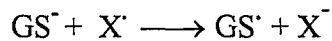
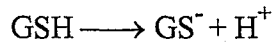


#### 1.7.5. Sülfidril Grupları

Glutasyonun serbest radikalleri süpürme özelliği, pKa değeri (GSH/GS<sup>-</sup>) yaklaşık 9.2 olan sülfidril gruplarıdır. Çünkü glutasyonun %1.2 si pH 7.3 te tiolat yapısındadır. Glutasyon gibi merkaptanlar, protonlanmış -SH gruplarındaki tek hidrojen atomunun transferiyle serbest radikalleri gidermektedir.

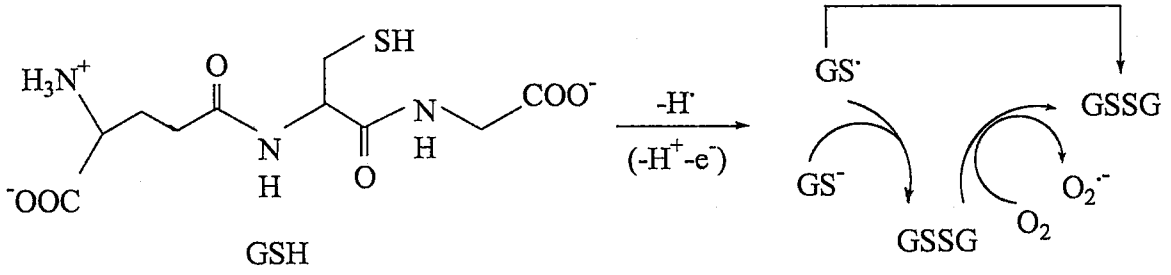


Alternatif olarak, GS<sup>-</sup> tek elektron dönörü olarak reaksiyona girebilir. Aşağıdaki reaksiyonlara göre,



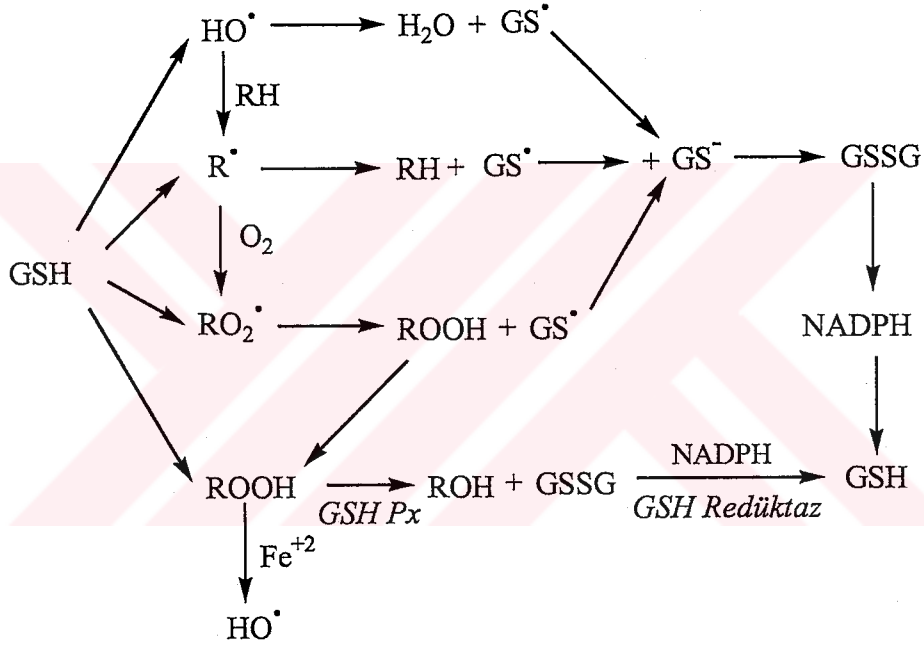
Glutasyon okside glutasyon meydana gelmesi için bir başka ara basamakta oluşan tiol radikali ile reaksiyona girer. Glutasyon pentoz fosfat yolunda meydana gelen NADPH ile indirgenmesi ile tekrar oluşur. Peroksidin serbest Fe<sup>2+</sup> iyonu ile olan reaksiyonları sonucu hidroksil radikalleri meydana gelir ve malondialdehit (MDA) oluşumunu hızlandırır (Şekil 8) [35].





Şekil 8. Hidrofilik antioksidant olan glutatyonun enzimatik olmayan etkisi

Glutasyon peroksit radikalleri, organik radikaller ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girebilir. Glutasyon peroksitler ve hidroperoksitlerin enzimatik indirgenmeleri için spesifik substrattır (Şekil 9) [36].



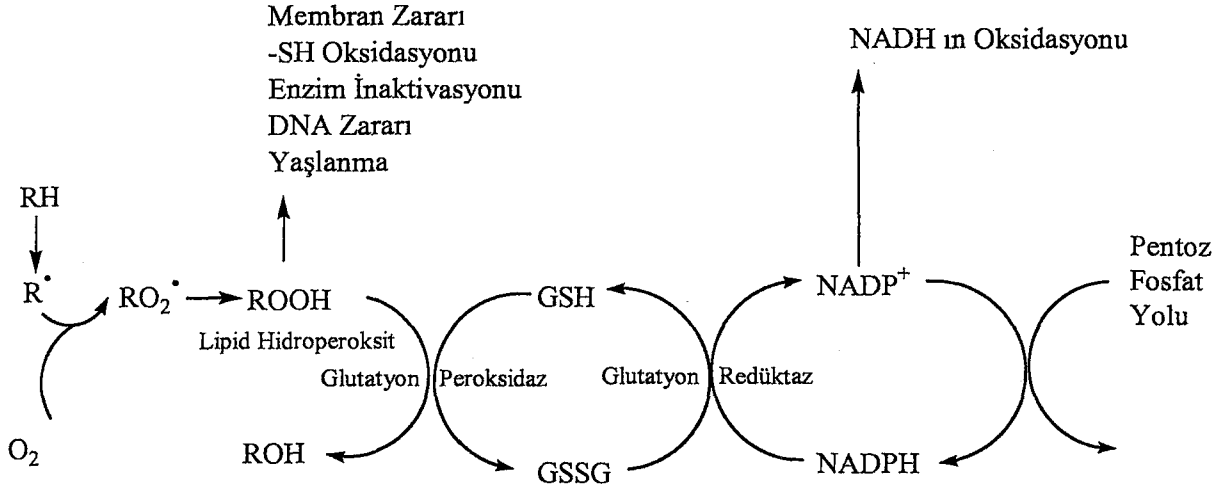
Şekil 9. Hidroperoksitler (ROOH), peroksit radikalleri (ROO'), organik radikaller (R') ve hidroksil radikalleri (HO') ile glutatyonun reaksiyonu

### 1.8. Lipid Peroksidasyonu

Reaktif oksijen metabolitleri etkisi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir. Lipid peroksitler Şekil 10 da gösterildiği gibi bir seri reaksiyon sonucu detoksifiye olur. Süperoksit ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mitokondride, mikrozomlarda ve diğer organellerde normal metabolizmalar sırasında meydana gelir. Bu substratlar süperoksit dismutaz, katalaz veya glutasyon peroksidaz tarafından katalizlenir. Fakat aşırı miktarda substrat oluşması halinde belli şartlar altında etkin olarak aktif hidroksil radikali ( $\text{HO}^\bullet$ ) veya singlet oksijen aktif hale gelebilir. İki substrattan biri örneğin membran lipidlerindeki lipidlerden H atomunu ayırır. Böylece lipid peroksidasyonu kendi kendine ortaya çıkar. Oluşan ürün  $\alpha$ -tokoferol tarafından



inhibe edilir. Reaktif oksijen metabolitlerinin aşırı oluşumu sonucu görülen bazı patolojik değişimlerle birlikte iskemi, radyasyon etkisi, inflammatasyon ve yaşlanmanın etkisiyle reperfüzyon yaralanma gibi diğer şartlar birbiriyle bağlantılıdır [36].

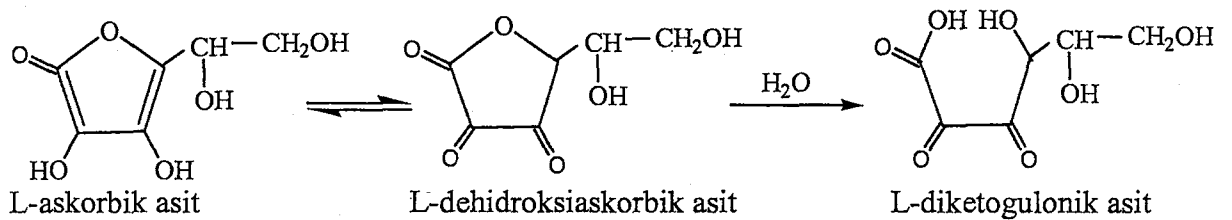


Şekil 10. Lipid peroksidasyonunu ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonu

## 1.9. Antioksidant Maddeler

### 1.9.1. L-Askorbik Asit

L-Askorbik asit, biber, maydanoz, turunçgiller ve ıspanakta bol miktarda bulunmaktadır. L-Askorbik asitin hastalıklara karşı organizmanın savunma mekanizmasını güçlendirdiği 1970 li yıllarda ortaya atılmıştır. L-Askorbik asit olarak bilinen C vitamini kimyasal yapı olarak bir ketolaktondur. Hayvansal ve bitkisel dokularda yüksek konsantrasyonda mevcuttur. İnsan kan plazması 100 mL de 1 mg kadar askorbik asit içerir. Çoğu yüksek hayvanlar ve bitkiler askorbik asidi glukoz ve diğer basit öncül maddelerden sentezlerler. Fizyolojik şartlarda dönüşümlü olarak L-dehidroksiaskorbik aside yükseltgenebilir ancak bu madde dönüşümsüz olarak C vitamini aktivitesi olmayan bir başka ürüne hidrolizlenebilir (Şekil 11).

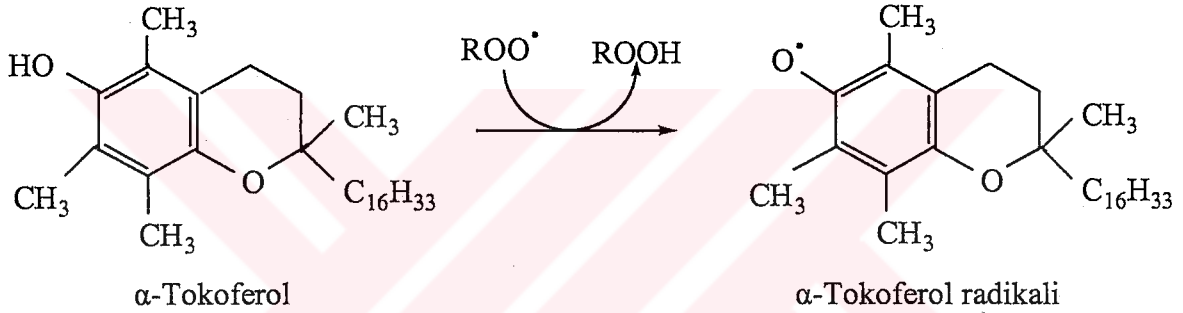


Şekil 11. L-Askorbik asit ve L-dehidroksiaskorbik asit

Askorbik asidin kuvvetli indirgen özelliği süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca ve etkin bir şekilde reaksiyona girerek iyi bir antioksidant olarak görev yapma kapasitesini sağlar. Askorbik asit fotooksidasyona karşı retina ve lens dokularını korur ve katarakt oluşumunu geciktirebilir [37].

### 1.9.2. $\alpha$ -Tokoferol

E vitamini etkisi gösteren bileşikler tokoferoller olarak tanımlanan kimyasal yapılara sahiptirler. Doğal olarak mevcut olan sekiz adet tokoferolden  $\alpha$ -tokoferol bir antioksidant olarak en aktif olanı ve doğada en yaygın olarak bulunanıdır. Tokoferollerin biyolojik olarak bu etkinliği halka sisteminde bulunan hidroksil grubunun varlığından kaynaklanır, bu bileşikler izoprenoid yan zincirleri de içerirler. Vitamin E' nin başlıca biyolojik fonksiyonu hücre bileşenlerini moleküler oksijen ve serbest radikallerin oksidasyonundan korumasıdır.

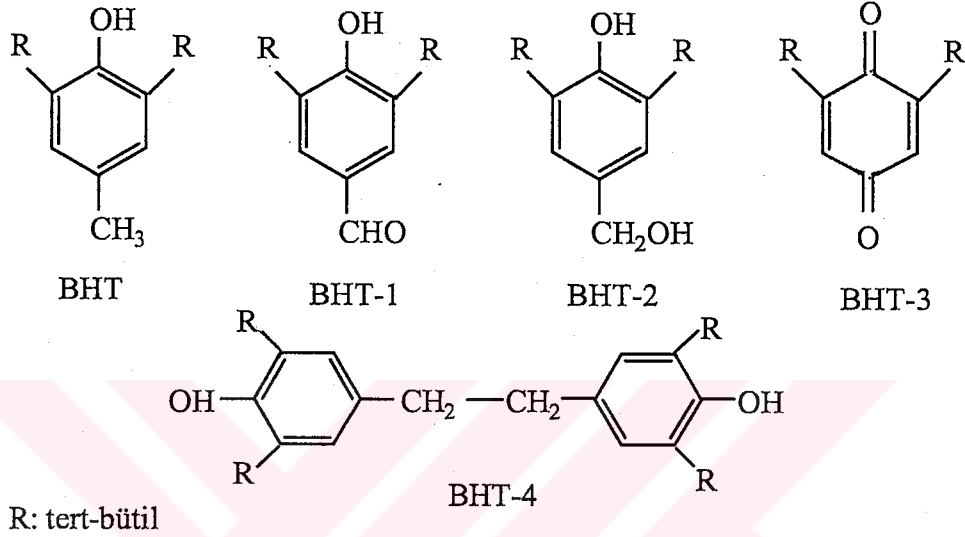


Şekil 17.  $\alpha$ -Tokoferol radikalinin oluşumu

Güçlü ve doğal bir antioksidant olan E vitamini, membran lipidlerini serbest oksijen radikallerinden koruyan ilk savunmayı gerçekleştirir. Süperoksit ve hidroksi radikallerini, singlet oksijeni ve lipid peroksit radikallerini süpürme yeteneği vardır. Taşıdığı fenolik hidrojeni peroksidasyona uğramış çok doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikallerine aktararak serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktadır. Oluşan serbest fenoksi radikali daha sonra bir serbest peroksit radikali ile reaksiyona girer ve böylece geriye dönüşümlü oksidasyona uğramayan  $\alpha$ -tokoferol, kroman halkası ve yan zinciri serbest radikal olmayan ürünlere yükseltgenmektedir. Oluşan oksidasyon ürünü, halka üzerindeki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjuge olarak safra salgısı ile atılmaktadır. Görevini tamamlayan  $\alpha$ -tokoferol tekrar kullanılmadığı için yenilenmesi gerekmektedir. Özellikle yer fıstığı, badem, pamuk gibi bitkilerin yağlarında ve keten tohumlarında bol bulunan E vitamini antioksidant özelliğinin yanı sıra, hücrede sinyal iletim mekanizmasındaki bazı basamaklar üzerinden hücre çoğalmasını da etkilemektedir. E vitamininin kalp hastalığı oluşma riskini azalttığı birçok araştırma ile gösterilmiştir [37].

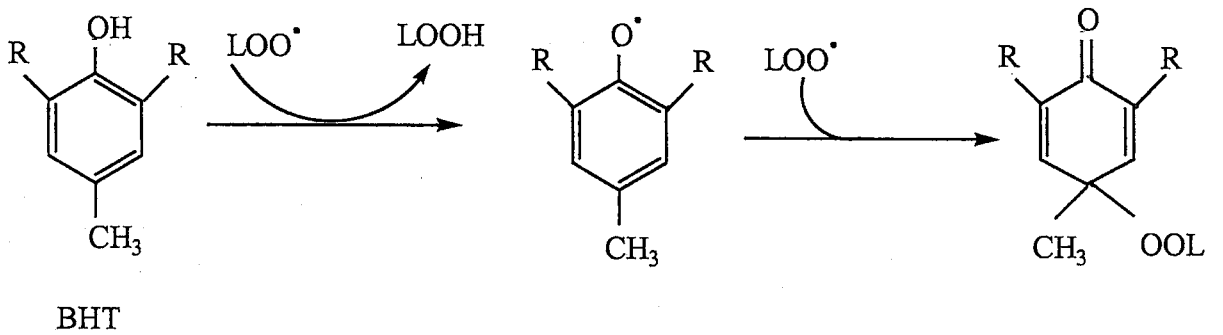
### 1.9.3. Bütillenmişhidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen en çok kullanılan antioksidantlardandır. BHT ilk defa soya yağının otooksidasyonunda bozunma ürünleri tayin edilerek fark edildi. BHT içeren soya yağı ultraviyole ışığına maruz bırakılacak olursa bozunma ürünleri olan BHT-1, BHT-2, BHT-3 ve BHT-4 oluşur (Şekil 12) [37].



Şekil 12. BHT'nin farklı türleri

BHT yağlar ve yağ asitlerinin oksidasyonunda okside olmuş lipidlerle verdiği reaksiyon sonucu peroksit radikallerinin etkisini yok eder (Şekil 13) [37].

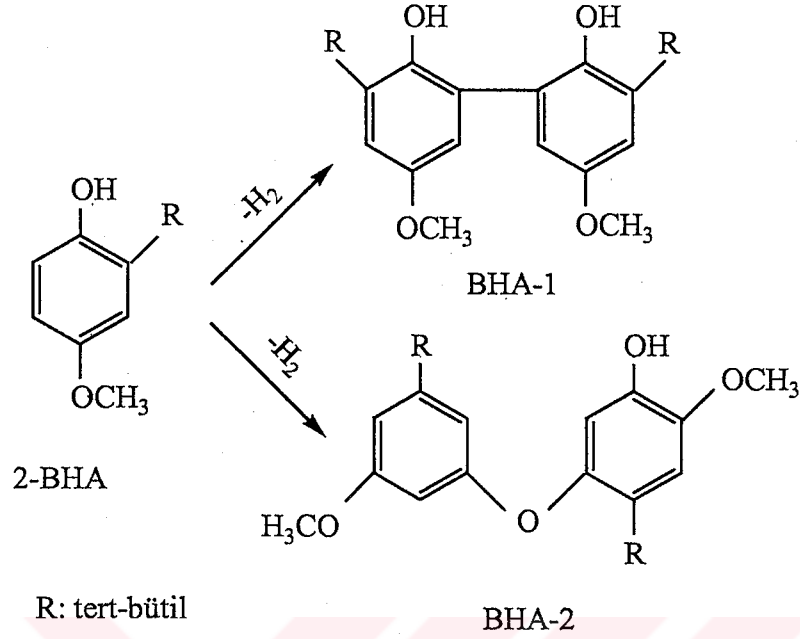


Şekil 13. BHT'nin yağ ve yağ asitlerinin oksidasyonuna etkisi

### 1.9.4. Bütillenmişhidroksianisol (BHA)

Yiyeceklerde antioksidant olarak kullanılan bütillenmiş hidroksianisol (2-BHA ve 3-BHA) 2- ve 3-izomerlerinin 9:1 karışımıdır. 2-BHA'nın kimyasal oksidasyonunda bifenil tipi dimeri olan BHA-1 oluşur. Alkolde 2-BHA ve 3-BHA izomerleri ultraviyole ve görünür

ışıkta etkilenir. Benzende 2-BHA ultraviyole ışıktta iki farklı oksidasyon ürünleri olan BHA-1 ve BHA-2 oluşturur (Şekil 14) [37].



Şekil 14. BHA' nin farklı türleri

#### 1.9.5. BHT ve BHA' nın Antioksidant Aktivitesi

BHT ve BHA sentetik antioksidant madde olarak yaygın kullanılmaktadır. Şekil 15 de BHT ve BHA ile DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) arasında meydana gelen reaksiyonlar gösterilmiştir. 2-BHA ve BHT ortama hidrojen atomu verebilmesi sonucu farklı radikalik ürünler meydana gelir. DPPH ve 2-BHA DPPH in aşırı miktarda 2-BHA ile reaksiyonundan DPPH H, 2-BHA ve DM (2,6-di-tertbutilkinon metit) meydana gelir. 2-BHA ile DPPH arasındaki reaksiyondan kararlı ara ürün oluşur. Bu ara ürün peroksit radikalleri 2-BHA nın tekrar oluşumu için BHT ile reaksiyona girer. Bu proses DPPH' ın hidrojeni tutması 2-BHA ve BHT arasındaki etkilere bağlıdır (Şekil 15).



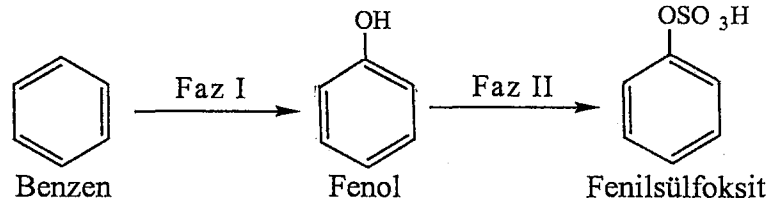
### 1.10. İlaç Metabolize Eden Enzimler

İlaç ve toksinlerin, daha doğrusu ksenobiyotiklerin karaciğer tarafından metabolizması çok çeşitli yollarla meydana gelir. Bunun nedeni, ksenobiyotiklerin yapılarındaki oldukça büyük farklılık yanında birçok farklı türdeki ksenobiyotik-modifiye eden reaksiyonların çokluğundan kaynaklanır. Bu reaksiyonların sayısı, keşfedilen kimyasalların sayısı arttıkça, çoğalmaktadır. Ksenobiyotikler, metabolizmaları için gerekli olan enzimler ve normal hücre metabolizması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerle metabolize edilirler.

Ksenobiyotiklerin hepatik metabolizması; oksidoredüktaz, hidrolaz ve transferazlar denilen üç enzim sınıfı tarafından katalizlenir. Oksidasyon-redüksiyon ve hidrolitik reaksiyonlar genellikle ana bileşik (ksenobiyotik) üzerinde karboksil, epoksit veya hidroksil grupları gibi aktif bölgeleri metabolik olarak üretilirler (Tablo 6). Bu kimyasal gruplar, transferaz enzimleri ile katalizlenen sentez reaksiyonlarında asetat, sülfat, glukuronik asit, glutatyon ve amino asitler gibi gruplar için birer akseptör olarak görev yaparlar. Oksidoredüktazlar ve hidrolazlarla katalizlenen ksenobiyotik metabolizması reaksiyonları, genellikle faz I (transformasyon) reaksiyonları ve transferazlar tarafından katalizlenen sentez reaksiyonları da faz II (konjugasyon) reaksiyonları olarak isimlendirilir. Tek bir ksenobiyotik çoğunlukla bu reaksiyonların bir veya daha fazlası ile metabolize edilirler.

Genellikle, faz I reaksiyonları konjugasyonlar şeklinde olan faz II reaksiyonları için gerekli kimyasal yapıyı sağlayan oksidatif, redüktif veya hidrolitik işlemlerdir. Bu reaksiyonlar bir ksenobiyotik molekülünün polaritesini veya sudaki çözünürlüğünü artırmaya meyillidir ve böylece onun atılma yeteneğini artırır. Bununla birlikte, faz I reaksiyonlarının bir ksenobiyotiği zehirsizleştirmek gibi gereksinimleri yoktur. Ayrıca bu enzimler sık sık toksik metabolitler de üretebilmektedir. Faz II reaksiyonlarının ürünleri, ana kimyasal bileşik dikkate alındığında genellikle daha toksik veya biyolojik olarak daha aktiftirler. Birçok durumda, faz II reaksiyonları, ksenobiyotiğin sudaki çözünürlüğüne, faz I reaksiyonlarının sebep olur ve daha da artırır. Bununla birlikte, faz I ve faz II reaksiyonlarının bileşimi organizma dahi yabancı bileşiklerin zehirsizleştirilmesi ve atılmasında ahenkli ve planlı bir etkiye sahiptirler. Fakat, birçok bileşik önce faz I reaksiyonlarından geçmeksizin faz II reaksiyonlarıyla metabolize edilirler. Örneğin, lipofilik bileşik olan benzen fenole dönüşerek faz I oksidatif metabolizmasına uğrar ve takiben de sülfat ile faz II konjugasyonuna uğrar.

Eğer organizma tarafından alınan yabancı bileşik fenol ise, suda çözünebilir bir bileşik olan fenilsülfoksit vermek üzere faz II konjugasyonuna uğrar. Bu bileşik daha ileri bir faz I türü reaksiyona da uğrayabilir.



**Şekil 18.** Fenilsülfoksitin faz I ve faz II reaksiyonu sonucu oluşumu

Bununla birlikte, genellikle faz I reaksiyonlarının fonksiyonu, bir ksenobiyotiğin yapısını modifiye etmek ve böylece sülfat, glukouronik asit veya diğer bazı oldukça polar gruplarla konjugasyon için uygun fonksiyonel grubu katmak, dolayısıyla tüm molekülü suda çözünebilir yapmaktır [38].

**Tablo 6.** Ksenobiyotiklerin metabolitik reaksiyonları

Metabolik Reaksiyonlar	Ksenobiyotik Metabolizması
<b>Alifatik hidroksilasyon</b>	$R-CH_3 \xrightarrow{[O]} R-CH_2OH$
<b>Epoksidasyon</b>	$  \begin{array}{c}  H \quad H \\    \quad   \\  C = C \\  / \quad \backslash \\  R_1 \quad R_2  \end{array}  \xrightarrow{[O]}  \begin{array}{c}  \quad O \quad \\  \quad / \quad \backslash \\  H \quad C \quad C \quad H \\  \quad \backslash \quad / \\  R_1 \quad R_2  \end{array}  $
<b>Aromatik hidroksilasyon</b>	$  \begin{array}{ccc}  \text{Aromatic Ring} & \xrightarrow{[O]} & \text{Phenol} \\  \uparrow & & \downarrow \\  \text{Aromatic Ring} & \xrightarrow{[O]} & \text{Phenol}  \end{array}  $
<b>O-, N- ve S- dealkilasyon</b>	$  \begin{array}{l}  R-O-CH_3 \xrightarrow{[O]} [R-O-CH_2OH] \xrightarrow{[O]} ROH + HCHO \\  \begin{array}{c} R' \\   \\ R-N-CH_3 \end{array} \xrightarrow{[O]} \begin{array}{c} R' \\   \\ [R-N-CH_2OH] \end{array} \xrightarrow{[O]} \begin{array}{c} R' \\   \\ R-NH \end{array} + HCHO \\  R-S-CH_3 \xrightarrow{[O]} [R-S-CH_2OH] \xrightarrow{[O]} RSH + HCHO  \end{array}  $
<b>Dealkilasyon</b>	$  \begin{array}{c}  Cl \\    \\  R-C-H \\    \\  Cl  \end{array}  \xrightarrow{[O]}  \begin{array}{c}  Cl \\    \\  R-N-OH \\    \\  Cl  \end{array}  + \begin{array}{c} O \\    \\ R-C-H \end{array}  + HCl  $
<b>N-hidroksilasyon</b>	$  \begin{array}{c}  H \quad O \\    \quad    \\  R-N-C-R'  \end{array}  \xrightarrow{[O]}  \begin{array}{c}  HO \quad O \\    \quad    \\  R-N-C-R'  \end{array}  $
<b>N-oksit oluşumu</b>	$  \begin{array}{c}  R_1 \\    \\  R_2-N \\    \\  Cl  \end{array}  \xrightarrow{[O]}  \begin{array}{c}  R_1 \\    \\  R_2-N^+-O^- \\    \\  Cl  \end{array}  $

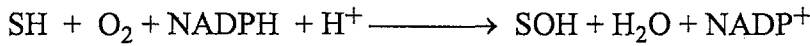


### 1.10.1. Faz I

Faz I reaksiyonları yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz reaksiyonları olarak aşağıdaki şekilde irdelenebilir.

Ksenobiyotiklerin maruz kaldığı oksidasyon reaksiyonlarının çoğunluğu, mitokondrial ve plazma enzimlerini de ihtiva etmesine rağmen mikrozomal monooksijenazlar tarafından katalize edilirler. Mikrozomal oksidasyonlar; aromatik hidroksilasyon, heterosiklik hidroksilasyon, N-, S- ve O-dealkilasyon, N-oksidasyon, N-hidroksilasyon, S-oksidasyon, desülfürasyon ve deaminasyon şeklinde sınıflandırılabilirler. Mikrozomal olmayan oksidasyonlar ise; amin, alkol, ve aldehit oksidasyonu, dealkilasyon, pürin oksidasyonu ve aromatisasyon şeklinde sınıflandırılırlar.

Oksidatif biyotransformasyonlar, ksenobiyotikler için önemli bir metabolik yoldur. Bu oksidatif reaksiyonların çoğunluğu sitokrom (cyt P450) esaslı mikrozomal monooksijenaz sistemi ile katalizlenir [18]. Çoğu memeli doku hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan bu sistem özellikle karaciğerde bolca bulunur. Karaciğer dokusunun homojenizasyonu ve bunu takiben ultrasantrifügasyon, endoplazmik retikulumu ayırır ve bu mikrozomal fraksiyon cyt P450 ihtiva eder. Monooksijenaz sistemi, cyt P450 ve NADPH cyt P450 ve NADH cyt b<sub>5</sub> redüktaz enzimlerini ihtiva eder. Cyt P450 bir hemoproteindir ve ksenobiyotiklerin yanında steroid gibi endojen substratların hidroksilasyonunda da rolü olan bir oksidazdır. Bu enzimin birçok izoenzimi vardır ve bunların bağıl oranları tür ve çevre etkileri gibi faktörle tayin edilir. Bu izoenzimler farklı substratların oksidasyonu veya aynı substratın farklı türden oksidasyonundan sorumludurlar. Cyt P450 nin aktif merkezinde yükseltgenmiş substrata bağlanabilen bir demir atomu (Fe<sup>+3</sup>) bulunur. Bu enzim substrat kompleksinin indirgenmesi, NADPH dan NADPH cyt P450 redüktaz yolu ile bir elektron transferi ile meydana gelir. Daha sonra enzim-substrat-oksijen kompleksi, su, oksitlenmiş substrat ve enzimin oksitlenmiş haline ayrılır. Net reaksiyon denklemi aşağıdaki gibi gösterilebilir.



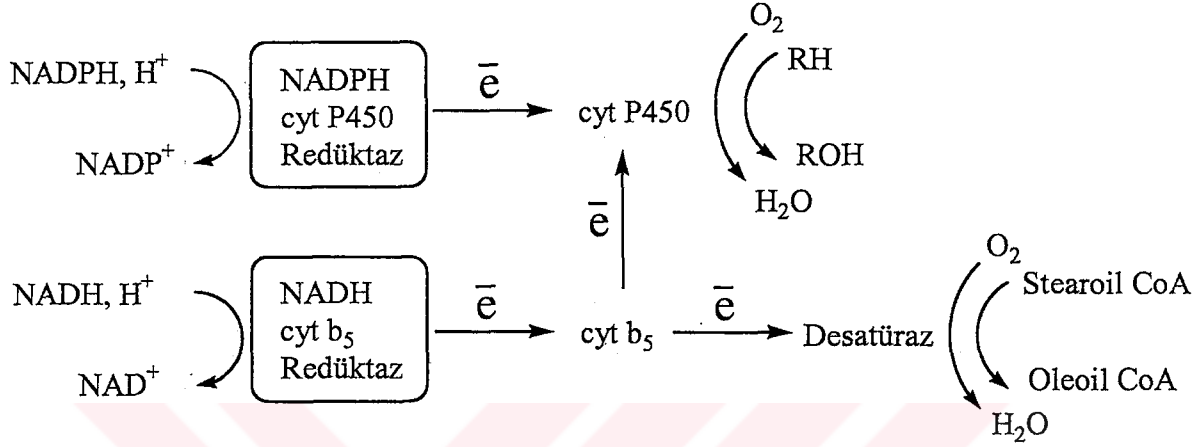
S: Substrat

Sitokromun indirgenmiş haline bağlanan karbon monoksit, oksidasyonu önler ve 450 nm de absorpsiyon pikine sahip bir kompleks verir ki, bundan dolayı bu protein ilk defa sitokrom P450 olarak adlandırılmış ve öylece kullanılagelmiştir.

Cyt P450 oksidasyon sistemi, özellikle endoplazmik retikulum membranlarındaki bir elektron-transferaz zinciridir. Bu sistem, nükleer membranlarda da bulunur. Fakat

metabolizmaya katılımı bu membranlarda oldukça azdır. Karaciğer, cyt P450 nin çok farklı formlarını ihtiva eder. Bu güne kadar, 9 farklı formu insan karaciğeri mikrozomlarında saflaştırılmıştır. Bu farklı formlar özel substrat spesifikliğine sahiptir ve böylece belirli substratların sadece bir cyt P450 formu tarafından metabolize edildiği açıktır.

Hepatik mikrozomlarda, P450 elektron-transport zincirinin organizasyonu aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Şekil 19).



Şekil 19. Mikrozomal elektron-transport sistemi

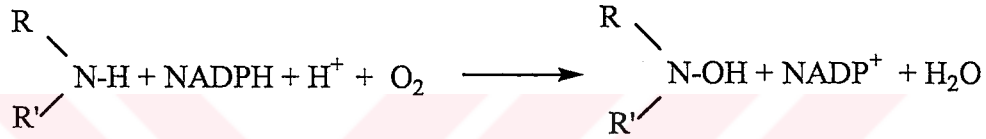
Şekil 19 dan da görüldüğü gibi, bir elektron kaynağı hidroksilasyon reaksiyonu için gereklidir ki burada temel kaynak, NADPH cyt P450 redüktaz enzimi yardımıyla indirgenmiş NADPH dir. Elektron çifti, NADPH nin piridin halkasının oksidasyonundan kaynaklanır. NADPH cyt c redüktaz enzimi bir flavoproteindir, ve flavinler de her defasında bir elektron transferini sağlayan koenzimlerdir. Ancak flavin iki elektron da salabilir. Cyt P450 biri FAD, diğeri FMN olan iki flavin koenzimi ihtiva eder. NADPH dan gelen elektron çifti FAD yoluyla enzime girer ve FMN ye transfer edilir. Flavoprotein elektronları ayırır ve her defasında biri cyt P450 ye transfer edilir.

Cyt P450 nin indirgenmiş NADH dan cyt b<sub>5</sub> zinciri yoluyla kabul edilen formları da vardır. Cyt b<sub>5</sub> mikrozomal membranlara bağlı yaklaşık 17 kDa molekül ağırlığına sahip bir hemoproteindir. Bu protein, elektronları NADH dan flavoprotein NADH cyt b<sub>5</sub> redüktaz yoluyla olur. Genellikle, bu elektron transport zinciri lipidlerin desatürasyonunda görev yapar. Bununla beraber, hidroksilasyon reaksiyonlardaki varlığı da önemlidir.

Substratın cyt P450 ye bağlanması, absorpsiyon spektrumunda karakteristik değişimler meydana getirir. Bu spektral değişimler hemoproteindeki merkezi demir elektronlarının yeniden organize olmasıyla ortaya çıkar. Protoporfirin halkasında bulunan

demir atomunun ferrik hali ( $Fe^{+3}$ ) 3 d alt kabuğunda 5 elektron içerir. Eğer bu elektronlardan ikisi çiftleşir ve bir orbitale girer ve diğer ikisi çiftleşir ve başka bir orbitale giderse, geriye çiftleşmemiş elektron kalır. Bu cyt P450 düşük-spin hali olarak isimlendirilir. Eğer bu beş elektron çiftleşmemiş ve farklı orbitalde iseler, maksimum spin yoğunluğu söz konusudur ve cyt P450 nin yüksek spin hali olarak tanımlanır [39].

Ksenobiyotiklerin oksidasyonundaki bazı mikrozomal yollara cyt P450 sistemi katılmaz. Bunlardan en önemli olanları azot ve kükürt oksidasyonudur. Bu oksidatif yolların birçoğu, karaciğerde en bol bulunan flavoproteinlerden biri olan başlangıçta amin oksidaz olarak adlandırılan bir mikrozomal flavoprotein tarafından katalize edilirler. Bu enzim, sekonder aminlerin NADPH-bağımlı hidrosilasyonun, tersiyer aminlerin N-oksidasyonun ve N-hidroksiaminlerin kararsız nitronlara oksidasyonunu katalizler. Primer aminler bu enzim ile katalize edilmezler .



Mikrozomal FAD-monooksijenaz kükürtde de oksidasyonu katalizler. Dolayısıyla amin oksidaz ismi uygun değildir, bu enzim mikrozomal FAD-içeren monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz olarak isimlendirilmektedir. Bu enzim, cyt P450 reaksiyonlarında olduğu gibi oksijen molekülünde sadece bir oksijen atomunu substrata ilave eder, diğer oksijen atomu suyun oluşmasında kullanılır.

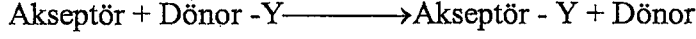
Karaciğer, amin-oksitleyen enzimleri hücrenin çözünen kısmında ve mitokondri dış membranlarında ihtiva eder. Bu enzimler, mikrozomal monooksijenazlar için substrat olmayan primer aminleri oksitlediklerinden önemlidirler. Hücrenin çözünen kısmında diamin oksidaz şeklinde bilinen ve  $Cu^{+2}$  iyonlarını ihtiva eden diamin oksidaz enzimi mevcuttur. Mitokondri dış membranında ise, mono amin oksidaz olarak isimlendiriliren ve FAD ihtiva eden diğer bir enzim mevcuttur. Her iki enzimde de aşağıda gösterildiği gibi aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizlenir.



Dolayısıyla, bu enzimler oksijenaz isminden ziyade oksidaz olarak bilinirler. Çünkü, bu enzimler substrata moleküler oksijenden kaynaklanmayan oksijen atomunu ilave ederler. Mono ve diamin oksidazlar aynı ürünleri vermelerine rağmen oldukça farklı kofaktörlere ve reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler [38].

### 1.10.2. Faz II

Faz II reaksiyonları veya konjugasyon reaksiyonları terimi, transferaz türü reaksiyonlara uygulanır. Glutasyon transferazlar hariç, bu reaksiyonlar aşağıdaki genel şemayı takip eder [40].



Burada Dönör-Y, daima transferi kolaylaştıran yüksek enerjili bir Y formudur. Ksenobiyotik ise genellikle akseptördür.

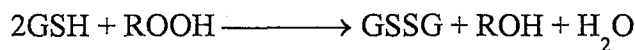
Bu reaksiyonlar, genellikle polar ve hücrede kolayca bulunabilen endojen grupların yabancı kimyasallara katılmasını sağlar. Bu gruplar, ksenobiyotik üzerinde mevcut uygun fonksiyonel gruba ilave edilir veya faz I metabolizması ile katalizlenir. Bu işlem, tüm molekülü daha polar ve lipide de daha az çözünür yapar. Böylece, türevlenmiş bileşiğin organizmadan atılımı kolaylaşır. Konjugasyon reaksiyonlarında salınan gruplar, genellikle ara metabolizma sırasında oluşturulur ya da kullanılırlar.

#### 1.10.2.1. Glutasyon S-Transferaz (E.C. 2.5.1.18)

Glutasyon S-transferazlar, ksenobiyotik üzerinde kolayca ayrılabilen bir grupla glutasyonun (GSH) yer değiştirdiği çok çeşitli substitüsyon reaksiyonunu katalizler [39]. GSH;  $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisinden oluşan bir tripeptittir ve transfer reaksiyona giren grup sisteinin serbest tiol (-SH) grubudur. Reaksiyon aşağıdaki şekilde özetlenebilir.



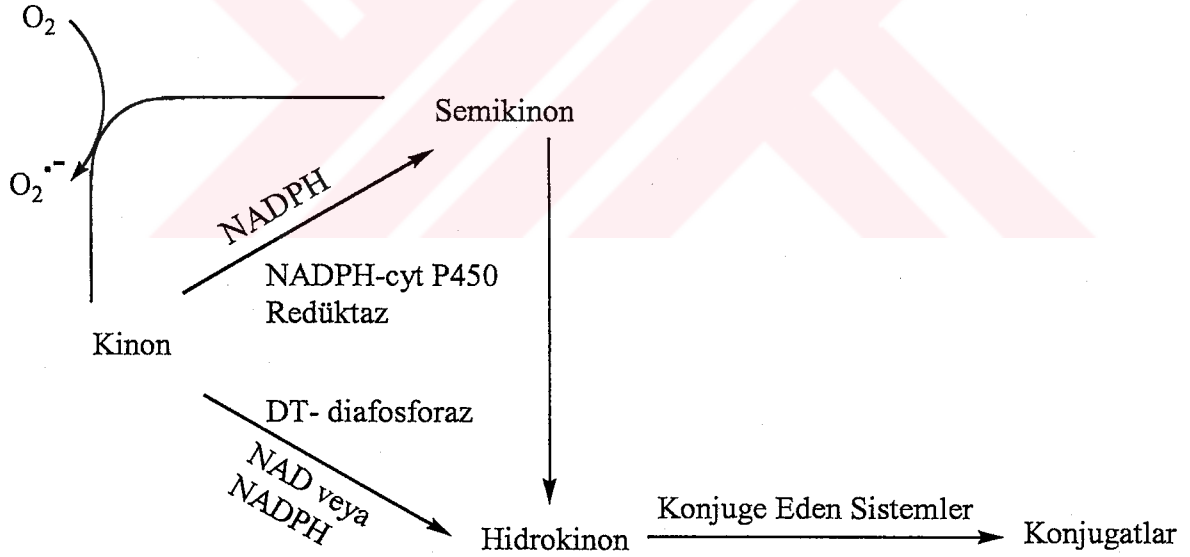
GSH, ksenobiyotik üzerindeki elektrofilik gruba saldırma yeteneğine sahiptir. Elektrofilik bileşikler, genellikle proteinler üzerindeki -SH ve nükleik asitlerdeki amin merkezlerine saldırabilirler. Dolayısıyla GST' ler bu çok reaktif ksenobiyotiklerin GSH ile çabucak zehirsizleştirilmesini sağlamaları ve böylece toksik reaksiyonları önlemeleri bakımından oldukça önem arz ederler. Uygun elektrofilik merkezlere sahip bileşiklerin sayısı oldukça fazladır ve yapısal olarak da çeşitlilik gösterirler. Dolayısıyla bu reaksiyonlarda katalizör görevi yapan çeşitli enzimler S-alkil transferaz, S-aril transferaz ve S-epoksit transferaz şeklinde isimlendirilmiştir. Ancak bu terminoloji, bu reaksiyonların farklı enzimler tarafından katalizlendiğinin ortaya çıkması ile geçerliliğini kaybetmiştir. Ayrıca bazı glutasyon S-transferazlar, organik hidroperoksitlerin zehirsizleştirilmesini katalizleyen peroksidazlar olarak görev yaparlar [41].



Glutasyon S-transferazlar özellikle karaciğer hücresinin çözünebilir kısımlarında ve aynı zamanda da mikrozomlarda bulunurlar. Ksenobiyotiklerin, GSH ile çabuk birleşmesi (konjugasyon) hücrel GSH stokunun azalması ile sonuçlanır. Böyle durumlarda elektrofilik bileşikler çok yavaş zehirsizleştirilir ve toksik hasar ihtimali artar. Buna karşın sistein yada türevlerinin alımı, GSH sentezinin hızını artıracığından belirli elektrofilik bileşiklerin toksitesini ortadan kaldırmada etkili olacaktır.

#### 1.10.2.2. DT-diafosforaz (E.C. 1.6.99.2)

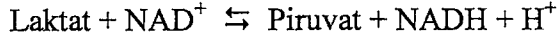
Flavoprotein DT-diafosforaz [NAD-(P)H: kinon oksidoredüktaz] elektron dönörü NADPH veya NAD ile kinonları indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Kinonlar iki elektron transfer edebilen DT-diafosforaz enzimi tarafından indirgenildiğinde, konjugasyon reaksiyonlarıyla oldukça kararlı hidrokinonlar oluşur. NAD(P)H okside flavoproteinler arasında tek olan DT-diafosforaz tek elektron transfer eden enzimdir ve süperoksit radikali oluşumu ile oluşan otookside semikinonlar meydana gelir. Bir ve iki elektron transfer eden kinon redüktazlar birlikte var olduklarında, kinon kararlı hidrokinona dönüşmesiyle sınırlı otooksidasyon oluşur (Şekil 20) [42].



Şekil 20. Kinonun DT-diafosforaz tarafından indirgenmesi

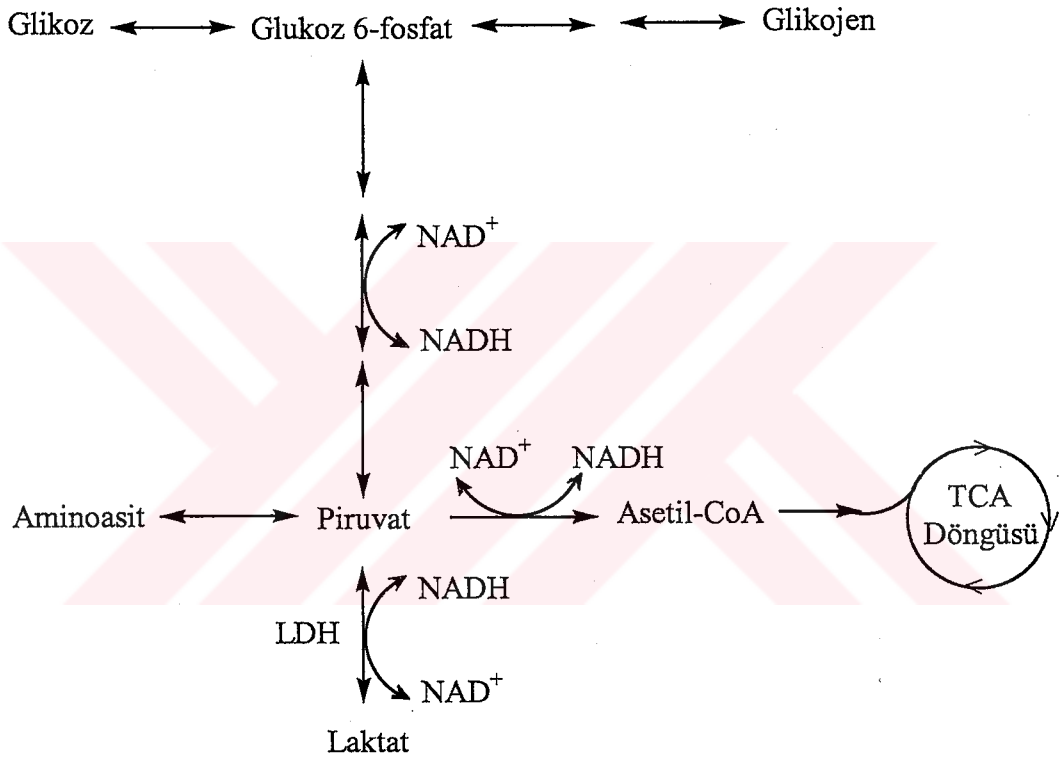
#### 1.11. Laktat Dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.27)

Piruvatın laktik asite indirgenmesini katalize eden enzim laktat dehidrogenazdır. Laktat dehidrogenaz laktattan okside formundaki  $NAD^+$  ye elektron transfer eder ve reaksiyon sonunda indirgen  $NADH$  oluşur. Reaksiyon iki yönlü yürümektedir.



Laktat ve piruvatın 340 nm de ışık absorpsiyonu vermemesine karşın NADH ışığı absorbe eder.

Piruvat karbonhidratlardan, glikolizle veya amino asitlerden; anaerobik koşullarda laktat dehidrogenaz (LDH) yardımıyla laktata dönüşür. Fakat oksijenin serbestçe elde edilebildiği durumlarda piruvat TCA döngüsüne girmek üzere metabolize edilir. TCA döngüsü ve glikoliz yolu, hücrenin kullanımına uygun olması bakımından çok önemlidir. Her ikisi de enerji metabolizmasında önemli ara ürün olan ATP'nin sentezini yürütür. Laktat yalnızca piruvattan oluşur ve yalnızca piruvata metabolize olur [43].



Şekil 21. Piruvat İnsan metabolizması



### 1.12. Çalışmanın Amacı

Reaktif oksijen türleri (ROT), süper oksit iyonları, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest olmayan radikal türleri olan aktifleşmiş oksijenin farklı şekilleridir [44]. Canlı organizmalarda farklı ROT farklı şekillerde meydana gelebilir. Polimorfolojik makrofaj ve lökosit çekirdeklerinin uyarılması, normal oksijenli solunum ve peroksizomlar hücre tarafından üretilen oksidantların hücre içi kaynaklarıdır. Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları tütün dumanı, iyonlaştırıcı radyasyon, bazı kirleticiler, organik çözücüler ve pestisitlerdir [45,46]. Serbest radikaller, hücre ve organel membranları düzeyinde lipid peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu ve DNA yapısında bazı değişiklikleri yolları ile hücre hasarına neden olmaktadır. Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde ROT aracılığı ile oluşan oksidatif hasar yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları ve kanser gibi, doku fonksiyonunun bozulması ile karakterize hastalıkların başlıca nedeni olarak görülmektedir. ROT lar bir tek hücrede günde yaklaşık 10.000 DNA bazını oksidatif hasara uğratabilmektedir. Serbest radikallerin hasar oluşturucu etkileri hücre savunma sistemleri ile kontrol altında tutulmakta, ancak bazı durumlarda bu sistem yetersiz kalabilmektedir [34]. Bütün aerobik organizmaları oksidatif tehlikelere karşı koruyan antioksidant savunma mekanizmaları vardır [47]. Ancak antioksidantların savunma mekanizması yeterli olmayabilir. Böylece antioksidant bileşiklerin besinler ile alınması önemlidir [45]. Yiyeceklerin saklanması kullanılan BHA ve BHT gibi bazı sentetik antioksidant bileşiklerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu bileşiklerin bazı yan etkileri vardır [48]. Antioksidant bakımından zengin yiyeceklerin besin olarak alınması ve birçok hastalığa karşı etkileri arasında ters bir ilişki vardır [49]. Bundan dolayı doğal antioksidantların belirlenmesi için yapılan araştırmalar önemlidir.

Tedavi için tıbbi bitkilerden yararlanma, aktif ya da aktif olmayan biyolojik maddelerle organizma üzerinde etki sağlamaktadır. Aktif ve aktif olmayan maddeler dokular aracılığıyla emilmelerini, idrar veya safra yoluyla boşaltılmalarını geciktirir ya da hızlandırır. Bunların etkisi, tıbbi bitkilerin belli başlı aktif biyolojik bileşiklerinin etki gücünde olumlu değişikliklere yol açar. Böylece son yıllarda, çok sayıda tıbbi bitkinin, başlıca aktif maddeye paralel olarak bir dizi biyolojik bileşiği de içerdiği; bunlardan bazılarının antikor sentezini uyararak ve organizmanın bağışıklığını pekiştirerek proteinlerin biyo-sentezi üzerinde etkili oldukları saptanmıştır. Tıbbi bitkilerden elde edilen aktif biyolojik maddeler günümüzde daha da çok önem kazanmıştır [50]. Böylece tıbbi bitkilerin bir çok bilim dalı açısından geniş ölçekli *in vitro* ve *in vivo* araştırmaları da bu süreci hızlandıracaktır.



Normal aerobik hücrede solunum sırasında reaktif oksijen üreten (prooksidantlar ve serbest radikaller) türlere karşı organizmadaki savunma sistemleri dışardan (enzimatik ve enzimatik olmayan) veya besin kaynaklı (vitaminler, karatoneoidler, flavonoidler v.b.) olabilirler [51]. Doğal savunmalar prooksidantların etkisini gideremediğinde, hücre içi ve dışı makromoleküller (proteinler, lipidler ve nükleik asitler) hücre hasarına neden olan oksidatif etkiyle karşı karşıya kalır [52]. Epidemik çalışmalar, sebze ve meyvelerin bol miktarda alınması ile bazı kanser türleri ve kardiovasküler hastalıkların riskinin azalmasının ilişkili olduğunu desteklemektedir [53]. Böylece doğal ürünlerin etkin özelliklerinin araştırılması önemlidir.

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye’de yetişen ve halk arasında değişik amaçlar için kullanılan bazı bitkilerin antioksidant aktivitelerini araştırmaktır. Çalışmada kullanılan bitkiler *Origanum vulgare* L., *Thymus leucotrichus* L., *Origanum laevigatum* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L., *Urtica dioica* L., *Urtica pilulifera* L., *Satureja hortensis* L., *Viscum album* L. ve *Hypericum venustum* Fenzl. dir. Ayrıca doğal ve sentetik antioksidant maddelerden L-askorbik asit,  $\alpha$ - tokoferol, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) pozitif kontrol olarak antioksidant aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalara göre, en iyi antioksidant aktiviteyi gösteren *Urtica dioica* L. ve BHA kullanılarak *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. *Urtica dioica* L. nin etil alkol-su ekstraktının iki farklı dozunun (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı/14 gün) ve BHA (% 0,75 i kadar yem ile birlikte) *in vivo* antioksidantlar (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve sülfidril grupları), faz I (cyt P450 içeriği, NADPH cyt P450 Redüktaz, cyt b<sub>5</sub> içeriği ve NADH cyt b<sub>5</sub> Redüktaz), faz II (glutatyon S-transferaz ve DT-diafosforaz), glutatyon içeriği, lipid peroksidasyon ve laktat dehidrogenaz aktivitelerine etkileri karaciğerde kontrole göre karşılaştırılarak incelenmiştir. Böbrek, akciğer ve özofagusta süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S-transferaz ve DT-diafosforaz aktiviteleri de araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar şunlardır:

**Merck;**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ,  $\text{FeCl}_2$ , Tween 20 (% 96-108, d =1.1 g/mL), L-askorbik asit, trikloroasetik asit (TCA), HCl (% 37, d=1.19 g/mL),  $\text{FeCl}_3$ , KCl, NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NADH, NADPH, KCN, 2-tiobarbütirik asit (TBA),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (% 30.1, d=1.11 g/mL),  $\text{NaN}_3$ , ksantin,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , tris-(hidroksimetil) aminometan (trizma bazı), EDTA,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

**Sigma;** Bütilenmişhidroksianisol (BHA), bütilenmişhidroksitoluen (BHT), folin C reaktifi, bovin serum albumin (BSA), sodyum piruvat, 2,6-diklorofenolindofenol (DCIP), 5-5'ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), glutasyon (indirgen formu) (GSH), glutasyon (yükseltgen formu) (GSSG), glutasyon redüktaz, kümene hidrojen peroksit, ksantin oksidaz (mikroorganizmadan), sitokrom c (at kalbinden), süperoksit dismutaz (ekmek mayasından), sodyum kolat, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

**Across;** Linoleik Asit, (% 99.0), 1,1,3,3-tetrametoksiopropan (MDA) (d = 0.99 g/mL),

**Aldrich;**  $\alpha$ -tokoferol

**Delta;** Etanol (% 99.5), dietil eter (% 99.5), gliserin

**Reidel;** NaCl

**Carlo Erba;**  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

**Panreac;** Na-K tartarat, metanol (% 99.5, d=0.79 g/mL)

**Nevparin;** Heparin

**Habaş;** CO gazı (% 100)

### 2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda, Avery Berkel model terazi, Soksilet Cihazı, Liyofilizatör, Sanyo Medicoool termostatlı kromatografik buzdolabı, Volac model otomatik mikropipetler (50 ve 1000 $\mu\text{L}$ ), Clifton model sallantılı sabit sıcaklık su banyosu, Fisons model vorteks cihazı, Jenwey model pH metre, Sanyo model (MSE, MS 60) yüksek hızlı soğutmalı santrifüj, Sigma model yüksek hızlı soğutmalı santrifüj, Mistral 2000 model santrifüj (MSE, 1,500 x g), Sanyo model (MSE, Soniprep 15) sonikatör ve UNICAM (UV2-100) model UV/VIS spektrofotometre kullanıldı.

### 2.3. *In vitro* Deneyisel Çalışmalar

Tez çalışmasında *Origanum vulgare* L. (İstanbul Kekiği), *Thymus leucotrichus* L. (Kekik), *Origanum laevigatum* L. (Mercan köşk ), *Ocimum basilicum* L. (Reyhan otu),

*Mentha spicata* L. (Kıvırcık nane), *Urtica dioica* L. (Büyük ısırganotu), *Satureja hortensis* L. (Geyik otu), *Viscum album* L. (Ökse otu), *Hypericum venustum* Fenzl. (Binbirdelik otu) ve *Urtica pilulifera* L. (Karaisırgan otu) kullanıldı. Bitkiler serin ortamda ve gölgede kurutuldu. Daha sonra etil alkol-su karışımında (% 80 etil alkol ve % 20 H<sub>2</sub>O) soksilet cihazı kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstraktlar liyofilize edilerek -40 °C de saklandı. Bitkilerin antioksidant özelliği ve indirgeme gücünü karşılaştırmak için doğal ve sentetik antioksidant maddelerden L-askorbik asit, α-tokoferol, bütillenmişhidroksitoluen (BHT) ve bütillenmişhidroksianisol (BHA) standart madde olarak kullanıldı.

### 2.3.1. Antioksidant Aktivite Tayini

Çalışmada kullanılan bitkilerin ve sentetik antioksidant maddelerin 200 ppm'lik çözeltilerinin antioksidant aktivitesi Tiyosiyant Metodu kullanılarak tayin edildi [54,55]. İnkübasyon sırasında, linoleik asit emülsiyonundaki peroksidasyon spektrofotometrik olarak 500 nm' deki absorbans ölçülerek tayin edildi. Yüksek absorbans peroksit konsantrasyonun belirtisidir. Bu yöntemin esası, linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürününün spektrofotometrik olarak tayin edilmesidir. Antioksidant etkisi ile meydana gelen lipid peroksit miktarı zamana bağlı olarak belli aralıklarda absorbanstaki artma ve azalmalar kontrol ve standart antioksidant maddelerle karşılaştırılır. Tayinde oluşan peroksidasyon ürünü Fe<sup>+2</sup> nin yükseltgenmesi sırasında meydana gelen değişimler izlenir. Antioksidant aktivite absorpsiyonla (500 nm) ters orantılıdır.

Bitkilerin liyofilize edilmiş ekstraktından ve standart antioksidant maddelerden 200 ppm konsantrasyonda 100' er mL' lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden ve kontrolden 0,1' er mL. Potasyum fosfat tamponu (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (0.2 M, pH 7.0) ile 0.1 mL lik çözeltiler ve kontrol 2.5 mL'ye tamamlandı. Karışım üzerine 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımları deney tüpünde 37 °C de ve karanlıkta inkübe edildi. Peroksidasyon düzeylerinin tayini için karışım belirlenen zaman aralıklarında sıfırıncı saatten başlamak üzere her bir karışımdan 0., 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 27., 30. ve 33. saatlerde 0.1 er mL alındı. Oksidasyon düzeylerinin tayini için karışımlara sırayla etanol (2.7 mL), amonyumtiyosiyanat (0.1 mL, % 30) ve FeCl<sub>2</sub> (0.1 mL, 0.02 M; % 3.5 lik HCl'de) karıştırıldı. Karışımlar, bir dakika bekletildikten sonra 500 nm'deki absorbans değerleri okundu.

### 2.3.2. İndirgeme Gücü Tayini

Çalışmada kullanılan bitkilerin ve sentetik antioksidant maddelerin 200 ppm' lik çözeltilerinin İndirgeme Gücü Oyaizu Metodu' na göre tayin edildi [54,55]. Doğal antioksidantların ve standart antioksidant maddelerin  $Fe^{+3}$  ün  $Fe^{+2}$  ye indirgemesi esasına dayanır. Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin çözeltilerinden 1.0' er ml alındı. Kontrol, kullanılan bitkiler ve standart antioksidant madde çözeltileri sıra ile; potasyum fosfat tamponu ( $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ ) (0.2 M, 2.5 mL, pH 6.6) ve potasumhekzasiyanoferrat (2.5 mL, % 1.0) ile karıştırıldı. Daha sonra, 50 °C de 30 dakika inkübe edildi. Ardından, %10 luk TCA çözeltisinin 2.5 mL' si karışıma eklenerek 3000 rpm de 10 dakika santrifüjlendi. Berrak çözeltinin 2.5 mL' si, 2.5 mL deiyonize su ve  $FeCl_3$  (% 0.1, 0.5 mL) ile karıştırıldı. Karışımın absorbası 700 nm de ölçüldü. Reaksiyon karışımındaki absorbans artışı bitki ekstresinin indirgeme gücünün yüksek olduğunun belirtisidir.

### 2.3.3. Bitkilerin ve Standart Antioksidant Maddelerin İnhibisyon Değerlerinin Hesaplanması

İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Kontrolün absorpsiyonundaki değişime göre inhibisyon değeri belirlenir.

İnhibisyon (%) (Linoleik asidin peroksit formundaki kapasitesi) =  $[1 - (\text{Örneğin Absorbansı (500 nm)}) / (\text{Kontrolün Absorbansı (500 nm)})] \times 100$

## 2.4. *In vivo* Deneysel Çalışmalar

### 2.4.1. Deney Hayvanı (*Swiss albino*)

Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen erkek *Swiss albino* (8-9 haftalık) deney hayvanları *in vivo* çalışmalar için kullanıldı. Deney hayvanlarına hava sirkülasyonu olan ortamda uygulama yapıldı. Samsun Yem Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi tarafından üretilen standart pellet yem ve destile su verildi.

#### 2.4.1.1. Deney Hayvanı (*Swiss albino*) Yemi Bileşeni ve Besin Değerleri

Su (en çok) % 12.00, ham protein (en az) % 24.00, ham sellüloz (en çok) % 7.00, ham kül (en çok) % 8.00, HCl de çözünmeyen kül (en çok) % 2.00, NaCl (en çok) % 1.00, Ca (en az-en çok) % 1.00-% 1.80, P (en az) % 0.90, Na (en az-en çok) % 0.50-% 0.80, methionin (en az) % 0.60 ve ham maddeler (soya kapsülü, ayçiçek küspesi, mısır, buğday, buğday kepeği, aroma, balık unu, vitamin ve mineral ön karışımları) (en az-en çok) % 41.00-% 42.00 oranında içermektedir. Metabolik enerji miktarı 2650 kcal dir.

### 2.4.1.2. Deneysel Uygulama

Deney, *Urtica dioica* L. bitkisinin antioksidant, ilaç metabolize eden enzim sistemlerine, lipid peroksidasyon ve laktat dehidrogenaz aktivitesine etkisini belirlemek için *Swiss albino* deney hayvanı kullanılarak uygulandı. Deney hayvanları aşağıda belirtilen uygulama düzeninde dört gruba ayrıldı (Tablo 7). Her grupta sekiz deney hayvanı bulunmaktadır.

**Tablo 7.** Deney hayvanlarına ait uygulama dozu ve şekli

Grup	Uygulama Dozu ve Şekli
I.	Bu grup kontrol olarak kullanıldı. Deney hayvanlarına normal pellet yem ve ağızdan destile su verildi (14 gün).
II.	50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 0.1 mL destile suda çözülmüş <i>Urtica dioica</i> L. ekstraktı ağız yoluyla verildi. Deney hayvanlarına pellet yem ve destile su serbest verildi (14 gün).
III.	100 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 0.1 mL destile suda çözülmüş <i>Urtica dioica</i> L. ekstraktı ağız yoluyla verildi. Deney hayvanlarına pellet yem ve destile su serbest verildi (14 gün).
IV.	Deney hayvanlarının yedikleri günlük yemine % 0.75 BHA katıldı (14 gün). Bu grup pozitif kontrol grubudur.

Deney hayvanlarına verilen 50 mg/kg vücut ağırlığı ve 100 mg/kg vücut ağırlığı doz miktarı canlı sistemlerine olan etki düzeyinin tespiti için belirlendi. Bu iki farklı ekstre dozunun etkilerinin karşılaştırılması için BHA pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı [56,57].

### 2.4.2. *In vivo* Biyokimyasal Çalışmalar

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları deneyin başında ve sonunda tartıldı. Yem vermeye, deney hayvanları öldürülmeden bir gün önce son verildi. Deney hayvanları diyetil eterle kapalı kap içerisinde bayıltıldı, deri ve göğüs kafesleri kesildi. Her deney hayvanı için kalbin sol ventrikülünden 0.5 mL heparin verildi ve sağ ventrikül kesildi. Sol ventrikülden % 0.9 luk NaCl yavaş yavaş verilerek perfüzyon işlemi yapıldı. Sağ ventrikülden kan gelmeyinceye kadar perfüzyon işlemi 3-4 dakika sürdü ve tamamlandı. O anda deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus organları diğer organlardan uzaklaştırılarak alındı. Karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus organları düşük ısıya dayanıklı polipropilen tüplerin içerisine konulup, sıvı azot bulunan kap içerisine atıldı. Deney

hayvanlarının organları sıvı azot içerisinde laboratuvara taşınarak *in vivo* çalışmalar için -40 °C deki derin dondurucuda saklandı.

#### 2.4.2.1. Karaciğer Hücre Mikrozomal ve Sitozolik Fraksiyonlarının Hazırlanması

Derin dondurucuda bekletilen karaciğerler 0-4°C de bekletilerek dokuların tamamen gevşemesi sağlandı. Daha sonra karaciğere bağlı yağlı dokular uzaklaştırıldı. Karaciğerler deiyonize su ile iki kere ve 0.15 M Tris-KCl tampon [0.15 M KCl + (10 mM Tris-HCl, pH 7.4)] pH 7.4, çözeltisi ile bir kere yıkandı. Islak karaciğer dokuları süzgeç kağıdı üzerinde bekletilerek, dokular üzerinde bulunan suyun uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemler 0-4°C de kromatografik buzdolabında yapıldı. Karaciğer dokuları tartıldı, sıvı azot bulunan porselen kap içerisinde ezilerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı. Daha sonra tartılan karaciğer ağırlığının iki katı 0.15 M Tris-KCl tampon çözeltisi (pH 7.4) ilave edildi. Karaciğerle karıştırılan 0.15 M Tris-KCl tampon çözeltisi 0-4 °C deki kromatografik buzdolabında vorteks cihazı ile homojenize edildi. Homojenata 30 saniye aralıkla bir dakika sonikasyon işlemi uygulandı. Sülfidril gruplarının (-SH) tayini için elde edilen homojenattan 0.3 mL alınarak -40 °C de saklandı. Kalan homojenat ilk önce 10.000 x g de 4 °C de yüksek devirli soğutmalı santrifüj ile 20 dakika santrifüjlendi. Pellet kısım (çökelek) hücre zarı, çekirdek, peroksisom, mitokondri, lizozom, golgi cisimciği ve kırılmayan dokular içerir. Süpernatant (üst kısım) ise, mitokondri ihtiva eder. Elde edilen süpernatant 105.000 x g ve +4 °C de yüksek devirli soğutmalı santrifüj ile 60 dakika santrifüjlendi [58]. Süpernatantlar -40 °C de saklandı ve laktat dehidrogenaz (LDH), DT-diafosforaz (DTD), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) sitozolik biyokimyasal parametrelerinin analizlerinde kullanıldı. Mikrozomal fraksiyon, karaciğer ağırlığı başına 0.5 mL olacak şekilde 0.15 M Tris-KCl tamponu ile homojenize edildi. Elde edilen süspansiyon -40 °C de saklandı ve sitokrom P450 (cyt P450), sitokrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>), NADPH-Bağımlı sitokrom P450 redüktaz (cyt P450 R), NADH-Bağımlı sitokrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub> R), lipid peroksidasyon (LPO) mikrozomal parametrelerinin analizlerinde kullanıldı.

#### 2.4.2.2. Böbrek, Akciğer ve Özofagus Hücre Sitozolik Fraksiyonlarının Hazırlanması

Derin dondurucuda bekletilen böbrek, akciğer ve özofagus organları 0-4°C de bekletilerek dokuların tamamen gevşemesi sağlandı. Böbrek ve Akciğer organları deiyonize su ile iki kere ve 0.15 M Tris-KCl tamponu çözeltisi (pH 7.4) ile bir kere yıkandı. Özofagus dokusunun iç yüzeyi 0.15 M Tris-KCl tamponu çözeltisi (pH 7.4) ile 4-5 kez yıkandı. Islak



böbrek, akciğer ve özofagus dokuları süzgeç kağıdı üzerinde bekletilerek, dokular üzerinde bulunan suyun uzaklaştırılması sağlandı. İşlemler 0-4 °C deki kromatografik buzdolabında yapıldı. Böbrek, akciğer ve özofagus dokuları tartılarak içerisinde sıvı azot bulunan porselen kap içerisinde ezilerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı. Daha sonra böbrek, akciğer ve özofagus organlarının ağırlıklarınının 2.0 katı 0.15 M Tris-KCl tampon çözeltisi (pH 7.4) ilave edilerek 0-4 °C deki kromatografik buzdolabında vorteks cihazı ile karıştırılarak homojenize edildi. Homojenatlara 30 saniye aralıkla bir dakika sonikasyon işlemi uygulandı. Dokulardan elde edilen homojenatlar 15.000 x g de 4 °C de yüksek devirli soğutmalı santrifüj ile 30 dakika santrifüjlendi [58]. Elde edilen süpernatantlar -40 °C de saklandı ve DT-diafosforaz (DTD), glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) gibi sitozolik biyokimyasal parametrelerin analizlerinde kullanıldı.

#### 2.4.2.3. Protein Tayini

Elde edilen sitozollerin ve mikrozomların protein içeriği, Lowry metoduna göre tayin edildi [59]. Tayinde, standart olarak kristal BSA, % 2 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içerecek şekilde 0.1 N NaOH, % 1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, % 2 Na-K tartarat ve Folin Reaktifi kullanıldı. BSA ve Folin Reaktifi bire bir oranında seyreltilerek çözeltileri hazırlandı. Artan BSA konsantrasyonlarına karşın BSA (µg/mL) ve absorbans (660 nm) kalibrasyon eğrisi çizildi. Elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla değişik miktarlarda seyreltilerek hazırlanan sitozol ve mikrozom örneklerindeki protein miktarı, (protein, mg/mL) çizilen eğriden yararlanılarak bulundu.

#### 2.4.3. Antioksidant Enzimler

Bir çözelti ve doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Bunun için enzim hakkında şu bilgiler gerekmektedir.

1. Katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi,
2. Enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacı olup olmadığı,
3. Substrat ve varsa kofaktörü için K<sub>M</sub> değeri,
4. Optimum pH' sı,
5. Enzim kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı,
6. Substratın kayboluş veya ürünün teşekkül hızlarınının tespit edilebildiği basit bir analitik metod.

Enzimler, optimum pH' da ve doyumluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışır. Böylece sıfırıncı mertebeden bir reaksiyon oluşur. Kofaktörlü enzimlerle ilgili tayinlerde, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları doyumluğun çok üzerinde alınır.



Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani hız, enzim miktarı ile doğru orantılıdır ve çözeltilerdeki enzim seviyesini direkt olarak verir.

#### 2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [60]. Tablo 8 de belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.8 ve 25 °C de süperoksit radikali etkisiyle Cyt c nin indirgenmesi sonucu  $O_2^-$  radikali kaynağı olan ksantin-ksantin oksidaz oluşumu sonucu gözlemlendi. Süperoksit dismutazın değişik konsantrasyonlarda (ng/mL) standart çözeltileri hazırlandı. Tayinde standart süperoksit dismutaz çözeltileri (50  $\mu$ L) veya örnekler (50  $\mu$ L), çözelti A (2.9 mL) ve çözelti B (50  $\mu$ L) ile karıştırıldı. Artan SOD miktarına (ng/mL) karşı % inhibisyon kalibrasyon eğrisi (550 nm de) çizilerek değişik sitozolik örneklerdeki SOD aktivitesi Ünite/mg olarak bulundu.

Süperoksit dismutazın bir ünitesi uygun şartlar altında % 50 cyt c nin inhibe ettiği enzim miktarı olarak tanımlanır.

##### Reaktifler;

**Çözelti A:** 0.76 mg (5  $\mu$ mol) ksantin, 10 mL 1.0 mM NaOH de çözülür ve 24.5 mg (2  $\mu$ mol) cyt c ile karıştırılarak 50 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.8 (0.1 mM EDTA içerir) ile 100 mL ye tamlanır.

**Çözelti B:** 0.2 Ünite/mL ksantin oksidaz 0.1 mM EDTA da hazırlanır.

**Tablo 8.** Süperoksit dismutaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Çözelti A	2.90	2.90	2.90
Çözelti B	0.05	0.05	0.05
Sitozolik Protein	-	-	0.05
SOD	-	0.05	-
Deiyonize H <sub>2</sub> O	0.05	-	-
Toplam İnkübasyon Hacmi	3.00	3.00	3.00

#### 2.4.3.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [61]. Tablo 9 da belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.0 ve 25 °C de  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tüketilmesi sonucunda, 1 cm yolu bulunan 2.0 mL lik kuvars cam kiletlerde 240 nm de absorbanstaki değişim takip edildi.

Aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Ünite/mg} = \frac{\Delta A_{240} / \text{dakika} \times 1000}{43.6 \times \text{mg enzim} / \text{mL reaksiyon karışımı}}$$

**Tablo 9.** Katalaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	Kör (mL)	Örnek (mL)
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7.0	50 mM	-	1.00
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 mM	2.99	1.99
Sitozolik protein	5-15 mg/mL	-	0.01
Deiyonize H <sub>2</sub> O	-	0.01	-
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	3.00	3.00

#### 2.4.3.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [62]. Tablo 10 da belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.0 ve 25 °C de glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon üzerinden NADPH oksidasyonunun, 1 cm yolu olan 1.0 mL lik disposable küvetlerde 340 nm de,  $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değerine bağlı olarak hesaplandı.

**Tablo 10.** Glutasyon peroksidaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu , pH 7.0	0.1 M	0.500	50 mM
Glutasyon redüktaz	0.24 Ünite/mL	0.100	0.0024 Ünite/mL
GSH (ind.)	0.3 mM	0.100	0.03 mM
NADPH	0.2 mM	0.100	0.02 mM
Kümene Hidroperoksit	1.2 mM	0.090	0.108 mM
NaN <sub>3</sub>	1.125 M	0.010	11.25 mM
Sitozolik Protein	10-50 mg/mL	0.100	2-10 mg /mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.000	-

### 2.4.3.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Tayini

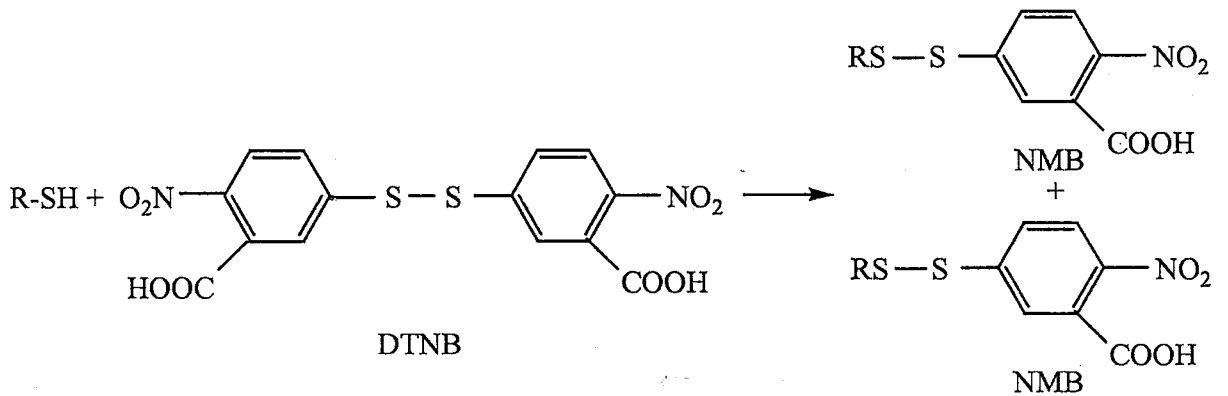
Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [63]. Tablo 11 de belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim, pH 8.0 ve 25 °C de yükseltgenmiş glutasyonun NADPH veya NADH ile indirgenmiş glutatyona indirgenmesini katalizler. Başka bir ifadeyle indirgenen her 1.0 mol GSSG başına 1.0 mol NADPH yükseltgenir. Enzim aktivitesi, 1 cm yolu olan 1.0 mL lik disposable küvetlerde 340 nm de ve NADPH ın oksidasyonu sebebiyle spektrofotometrik olarak absorpsiyondaki azalmalar takip edilerek hesaplandı ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**Tablo 11.** Glutasyon redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Tris. HCl Tamponu, pH 8.0	1.0 M	0.20	200 mM
EDTA	0.2 M	0.20	40 mM
Glutasyon (yük.)	50 mM	0.20	10 mM
NADPH	2.0 mM	0.20	0.4 mM
Sitozolik Protein	10-50 mg/mL	0.20	2-10 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.00	-

### 2.4.3.6. Elman Reaktifi ile Dokularda Sülfidril Gruplarının Tayini

Spektrofotometrik olarak yapılan bu işlemler, 5-5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) in dokulardaki sülfidril (-SH) grupları ile 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit (NMB) vererek indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 22) [64].



**Şekil 22.** Elman Reaktifi'nin mekanizması

#### 2.4.3.6.1. Toplam Sülfidril Gruplarının Tayini (T-SH)

Karaciğer doku homojenatındaki toplam sülfidril gruplarının içeriği, Elman Reaktifi (DTNB) kullanılarak tayin edildi. Tayinde, standart olarak 50 µL glutasyon (ind.) (50 µM-1000 µM), 500 µL 0.2 M Tris.HCl tamponu pH 8.2, 50 µL 0.01 M DTNB ve 400 µL metanol kullanıldı. Karışım 30 dakika 25 °C de inkübe edildi ve 15 dakika 3.000xg de santrifüjlendi. Artan glutasyon konsantrasyonuna (µM) karşı 412 nm de absorbans değerinden kalibrasyon eğrisi çizilerek doku homojenatındaki toplam sülfidril gruplarının içeriği µmol/g doku ağırlığı olarak bulundu.

#### 2.4.3.6.2. Proteik Olmayan Sülfidril Gruplarını Tayini (NP-SH)

Karaciğer doku homojenatındaki proteik olmayan Sülfidril gruplarının içeriği, Elman Reaktifi (DTNB) kullanılarak tayin edildi. Tayinde, standart olarak 50 µL glutasyon (ind.) (50 µM-1000 µM) ve 50 µL % 50 TCA karışımı 15 dakika 25 °C de inkübe edildi. Karışım 25 °C de 1500 rpm de 15 dakika santrifüjlendi. 50 µL süpernatant kısım, 900 µL 0.4 M Tris.HCl tamponu (pH 8.9) ve 50 µL 0.01 M DTNB karıştırılarak vortekslendi. Artan glutasyon konsantrasyonuna (µM) karşı 412 nm de absorbans değerinden kalibrasyon eğrisi çizilerek doku homojenatındaki proteik olmayan sülfidril gruplarının içeriği µmol/g doku ağırlığı olarak bulundu.

#### 2.4.3.6.3. Proteik Bağlı Sülfidril Gruplarını Tayini (PB-SH)

Toplam sülfidril grupları (T-SH) değerinden proteik olmayan sülfidril grupları değeri (NP-SH) çıkartılarak proteik bağlı sülfidril grupları (PB-SH) değeri hesaplandı.

### 2.4.4. İlaç Metabolize Eden Enzimlerin Tayini

#### 2.4.4.1. Faz I

##### 2.4.4.1.1. Cyt P450 Tayini

Cyt P450 tayini spektrofotometrik olarak tayin edildi [65,66]. 0.1 M Potasyum fosfat tamponu, pH 7.4, % 20 gliserin (v/v) ve 1 mM EDTA dan oluşan örnek karışımı ile 1.0 mL örnek mikrozom çözeltisi 5 mL ye seyreltildi. Son karışım konsantrasyonun % 5 i sodyum kolat olacak şekilde ayarlandı. Karışım iki eşit kısma bölündü ve örnek olarak kabul edilen kısımdan 20 saniye CO gazı geçirildi. Daha sonra küçük bir miktar örnek ve referans olarak kabul edilen karışımlara çok az bir miktar Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ilave edildi ve vortekslendi. Örnek olarak kabul edilen karışıma tekrar 40 saniye CO gazı geçirildi. 1 cm yolu olan kuvars küvet

içerisinden oda sıcaklığında ve 450 nm ile 490 nm arasındaki absorban değerleri okundu. Absorbanstaki farktan cyt P450 konsantrasyonu  $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  alınarak hesaplandı.

#### 2.4.4.1.2. Cyt b<sub>5</sub> Tayini

Cyt b<sub>5</sub> spektrofotometrik olarak tayin edildi [65]. 0.1 M Potasyum fosfat tamponu, pH 7.4, % 20 gliserin (v/v) ve 1 mM EDTA dan oluşan karışım ile 1 mL örnek çözeltisini 5 mL ye seyreltildi. Son karışımının konsantrasyonun % 5 i sodyum kolat olacak şekilde ayarlandı. Karışım iki eşit kısma bölündü ve iki ayrı küvete aktarıldı. Örnek olarak kabul edilen küvete az bir miktar sodyum ditiyonit ilave edildi. Enzim konsantrasyonu, 1 cm yolu olan kuvars cam küvetlerde 410 nm ve 424 nm deki indirgenmiş ve yükseltgenmiş fark spektrumuna bağlı olan,  $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değerinden hesaplandı.

#### 2.4.4.1.3. NADPH Bağımlı Cyt P450 Redüktaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [67]. Tablo 12 de belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.7 ve 25 °C de 1.0 enzim ünitesi 1 dakikada 1.0 mmol cyt c indirgenmesini katalizleyen enzim miktarıdır. Reaksiyon NADPH ilavesiyle başlatıldı. Başlangıç anında enzim konsantrasyonu 1 cm yolu olan 1.0 mL lik disposable küvetlerde 540 nm ve 550 nm deki cyt c nin indirgen ve yükseltgen hallerdeki absorpsiyon farkları alınarak ve  $\epsilon = 19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değeri kullanarak hesaplandı.

**Tablo 12.** NADPH-bağımlı cyt P450 redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7.7	0.3 M	0.175	52.50 M
Cyt c	1.1 mg cyt c/mL	0.700	0.77 mg cyt c/mL
NADPH	3.90 mM	0.025	0.09 mM
Mikrozomal Protein	10-50 mg/mL	0.100	1-5 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.000	-

#### 2.4.4.1.4. NADH-Bağımlı Cyt b<sub>5</sub> Redüktaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [67]. Tablo 13 te belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.5 ve 25 °C de

1.0  $\mu\text{mol}$   $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Reaksiyon NADH ilavesiyle başlatıldı. Enzim konsantrasyonu, 1 cm yolu olan 1.0 mL lik dispossible küvetlerde 420 nm de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ün indirgenmiş ve yükseltgenmiş absorpsiyon farkına bağlı olarak  $\epsilon = 19.6 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değerinden hesaplandı. Burada  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  elektron akseptörü olarak görev yapmaktadır.

**Tablo 13.** NADH-bağımlı-cyt  $b_5$  redüktaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7.5	0.1 M	0.820	82 mM
NADH	3.0 mM	0.040	0.12
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	5 mM	0.040	0.2M
Mikrozomal Protein	10-50 mg/mL	0.100	1-5 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.000	-

#### 2.4.4.2. Faz II

##### 2.4.4.2.1. DT-diafosforaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [68]. Tablo 14 te belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.5 ve 25 °C de 1.0  $\mu\text{mol}$  2,6-diklorofenol-indofenolün indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Enzim konsantrasyonu, 1 cm olan 1.0 mL lik küvetlerde 600 nm de 2,6-diklorofenol-indofenol olmaksızın (0. dakika) ve 2,6-diklorofenol-indofenol ilavesiyle (1 dakika sonra) absorpsiyona bağlı olarak  $\epsilon = 6.22 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değerinden hesaplandı. Burada 2,6-diklorofenol-indofenol elektron akseptörü olarak görev yapmaktadır.

**Tablo 14.** DT-diafosforaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7.5	0.05 mM	0.910	0.045 mM
KCN	0.33 mM	0.030	0.0099 mM
2,6-diklorofenol-indofenol	0.04 mM	0.030	0.0012 mM
Sitozolik Protein	10-50 mg/mL	0.030	0.3-0.5 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.000	-

#### 2.4.4.2.2. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [69]. Tablo 15 te belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 6.5 ve 25 °C de 1-kloro 2,4-dinitrobenzen (DTNB) ile glutasyonun reaksiyonundan 1 cm yolu olan 1.0 mL lik disposable küvetlerde 340 nm de  $\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  alınarak hesaplandı.

**Tablo 15.** Glutasyon S-transferaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 6.5	0.1 M	0.30	30 mM
DTNB	1.0 mM	0.30	0.3 mM
Glutasyon (ind.)	1.0 mM	0.20	0.2 mM
Sitozolik Protein	10-50 mg/mL	0.20	2-10 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.00	-

#### 2.4.5. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon düzeyi spektrofotometrik olarak tayin edildi [70]. Tablo 16 da belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. 2-tiobarbitirik asitin (TBA) aldehit ürünlerinden malondialdehitin (1,1,3,3-tetrametoksipropan; MDA) oluşumuna dayanır. Biyolojik numunelerdeki serbest radikal aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun en iyi göstergesi olarak en yaygın kullanılan TBA yöntemidir.

MDA, biyolojik materyallerde nadiren serbest ve bağlı şekillerde bulunur. Bağlı MDA sıcak asit veya alkali ortamda serbestleştirilir. Tayinde MDA-TBA kompleksi oluşturmak ve bağlı ortamdaki MDA ı serbestleştirmek için MDA-TBA solusyonu çözeltisi ile ısıtılmalıdır. Tablo 16 da belirtildiği gibi karışımlar ayrı ayrı vorteks cihazında homojenize edilerek karıştırıldı. Karışımlar sallantılı su banyosunda +80 °C de 45 dakika inkübe edildiler, buz banyosunda bekletilerek oda sıcaklığına getirildiler ve daha sonra karışımlar 25 °C de 10 dakika 3.000 rpm de santrifüjlendiler. 532 nm de köre karşı standart ve numunelerin absorbans değerleri okundu. Karaciğer mikrozomlarındaki lipid peroksidasyonu tayini için, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MDA (10 mM-10µM) ve absorbans (532 nm) kalibrasyon eğrisi çizildi. Elde edilen değerlerden mikrozomlardaki lipid peroksidasyon değerleri belirlendi.



**Tablo 16.** Lipid peroksidasyonu tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
0.15 M Tris.KCl, pH 7.5	1.9	1.9	1.9
MDA	-	0.1	-
% 30 TCA	0.5	0.5	0.5
52 mM TBA	0.5	0.5	0.5
Mikrozomal Protein	-	-	0.1
Deiyonize H <sub>2</sub> O	0.1	-	-
Toplam İnkübasyon Hacmi	3.0	3.0	3.0

#### 2.4.6. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi [71]. Tablo 17 de belirtildiği gibi reaksiyon karışımı kullanıldı. Normal deneme şartlarında enzim aktivitesi, pH 7.5 ve 25 °C de 1.0 µmol sodyum piruvatın indirgenmesini katalizleyen enzimdir. Reaksiyon NADH ilavesiyle başlatıldı. Enzim konsantrasyonu, 1 cm yolu olan 1.0 mL lik küvetlerde 340 nm de sodyum piruvatın yükseltgenmiş (NADH olmaksızın 0. dakika) ve indirgenmiş (NADH ilavesiyle 1 dakika sonra) absorpsiyon farkına bağlı olarak  $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  değerinden hesaplandı.

**Tablo 17.** Laktat dehidrogenaz aktivitesi tayininde kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	Stok Çözelti	İlave Edilecek Hacim (mL)	İnkübasyon Konsantrasyonu
Potasyum Fosfat Tamponu, pH 7.5	50 mM	0.846	42.3 mM
NADH	0.1 mM	0.020	0.002 mM
Sodyum Piruvat	0.5 mM	0.034	0.017 mM
Sitozolik Protein	10-50 mg/mL	0.100	1-5 mg/mL
Toplam İnkübasyon Hacmi	-	1.000	-

## 2.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

### 2.5.1. *In vitro* Deneysel Çalışma Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivite ve indirgeme gücü değerlerinin dağılımına Sapiro-Wilk normallik testi uygulandı. Örneklerin antioksidant aktivite ve indirgeme gücünün birbirinden farklı olup olmadığı iki yönlü ANOVA testi yapılarak değerlendirildi. Tüm bu işlemlerde SPSS 10.0 paket programı kullanıldı.

### 5.5.2. *In vivo* Deneysel Çalışma Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Grupların ortalama değerleri ve standart sapma değerleri (Ort. $\pm$  S.D.) hesaplandı. Dört grubun ortalama değerlerini karşılaştırmak için önce ANOVA testi, daha sonra çoklu karşılaştırma testleri yapıldı. Gruplar arasındaki değişim kontrole bağlı olduğundan DUNNET t-testinden yararlanılarak sonuçlar değerlendirildi. Tüm bu işlemlerde SPSS 10.0 paket programı kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *In vitro* Sonuçların Değerlendirilmesi

##### 3.1.1. Bitkilerin Antioksidant Aktivitesi

Tez çalışmasında, *Origanum vulgare* L. (İstanbul Kekığı), *Thymus leucotrichus* L. (Kekik), *Origanum laevigatum* L. (Mercan köşk ), *Ocimum basilicum* L. (Reyhan otu), *Mentha spicata* L. (Kıvrıkcık nane), *Urtica dioica* L. (Büyük ısırganotu), *Satureja hortensis* L. (Geyik otu), *Viscum album* L. (Ökse otu), *Hypericum venustum* Fenzl. (Binbirdelik otu) ve *Urtica pilulifera* L. (Karaisırgan otu) nin etil alkol-su karışım (% 80 etil alkol ve % 20 H<sub>2</sub>O) liyofilize edilmiş ekstraktlarının antioksidant aktivitesi Tiyosiyanat Metodu' na göre tayin edildi. 37 °C İnkübasyon sırasındaki emülsiyonda oluşan peroksit miktarı 500 nm de spektrofotometrik olarak tayin edildi. L-askorbik asit, α-tokoferol BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Yüksek absorbans peroksitlerin yüksek konsantrasyonda oluşmasının belirtisidir. Linoleik asitin oksidasyonu belirgin şekilde bütün ekstraktlar tarafından inhibe edildi. Sonuç olarak *in vitro* antioksidant aktivite değerleri sırasıyla *Urtica dioica* L. > *Satureja hortensis* L. > *Urtica pilulifera* L. > BHA > *Thymus leucotrichus* L. > *Origanum vulgare* L. > α-tokoferol > *Origanum laevigatum* L. > L-askorbik asit > BHT > *Viscum album* L. > *Hypericum venustum* Fenzl. > *Ocimum basilicum* L. > *Mentha spicata* L. > kontrol şeklinde değişmektedir (Tablo 18 ve Şekil 23).

Kontrolün 30. saattaki oksidasyonuna göre bitki ekstraktlarının ve standart antioksidant maddelerin inhibisyon değerleri hesaplandı (Tablo 19 ve Şekil 24). Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin 30. saat sonunda ölçülen 500 nm'deki absorbans değerlerine göre; bitkilerden *Urtica dioica* L. ve standart antioksidant maddelerden BHA'nın inhibisyon etkisi daha yüksektir. *Urtica dioica* L. % 80.57 ve BHA % 79.28 inhibisyon değerine göre en yüksek antioksidant aktiviteyi göstermektedirler.

Elde edilen sonuçlara bağlı olarak oksidasyon sıralaması linoleik asitin 30. saat sonundaki inhibisyon değerini desteklemektedir. *Urtica dioica* L. bitkisi ve standart antioksidant maddelerden BHA en yüksek antioksidant aktiviteyi gösterdi.

Tablo 18. Bitkilerin antioksidant aktiviteleri ile standart antioksidant maddelerle peroksidasyon düzeylerinin değerlendirilmesi

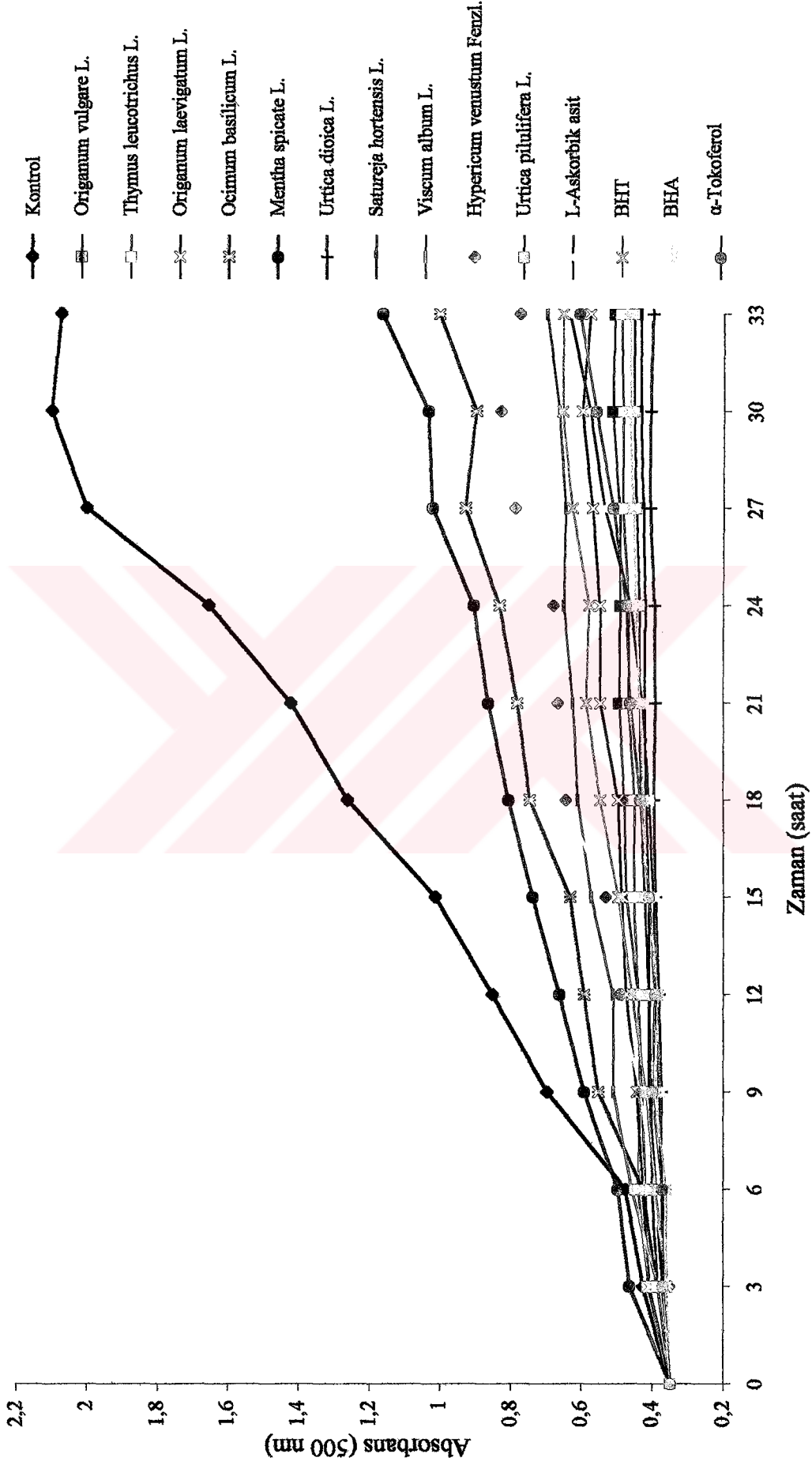
Zaman (Saat)	K	Ov	Tl	Oi	Ob	Ms	Ud	Sh	Va	Hv	Up	Aa	BHT	BHA	Tk
0	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
3	0,425	0,412	0,41	0,409	0,386	0,464	0,372	0,372	0,385	0,353	0,386	0,369	0,360	0,359	0,370
6	0,475	0,420	0,441	0,428	0,428	0,498	0,374	0,390	0,458	0,401	0,402	0,375	0,392	0,361	0,371
9	0,696	0,430	0,435	0,444	0,554	0,594	0,375	0,410	0,510	0,435	0,405	0,382	0,419	0,392	0,400
12	0,851	0,440	0,440	0,474	0,594	0,664	0,382	0,410	0,512	0,495	0,411	0,391	0,457	0,384	0,393
15	1,013	0,475	0,452	0,488	0,634	0,739	0,391	0,412	0,574	0,534	0,422	0,398	0,497	0,412	0,411
18	1,260	0,480	0,450	0,498	0,746	0,806	0,396	0,417	0,611	0,645	0,433	0,411	0,548	0,428	0,435
21	1,421	0,494	0,469	0,547	0,782	0,864	0,392	0,423	0,625	0,667	0,437	0,429	0,582	0,436	0,463
24	1,653	0,492	0,467	0,549	0,832	0,906	0,394	0,421	0,650	0,681	0,437	0,462	0,579	0,448	0,474
27	2,000	0,494	0,484	0,570	0,929	1,023	0,407	0,428	0,646	0,789	0,448	0,536	0,628	0,456	0,512
30	2,100	0,515	0,484	0,600	0,900	1,036	0,408	0,435	0,665	0,831	0,454	0,578	0,657	0,466	0,560
33	2,072	0,509	0,490	0,577	1,004	1,166	0,401	0,434	0,700	0,776	0,455	0,637	0,655	0,465	0,608

K: Kontrol

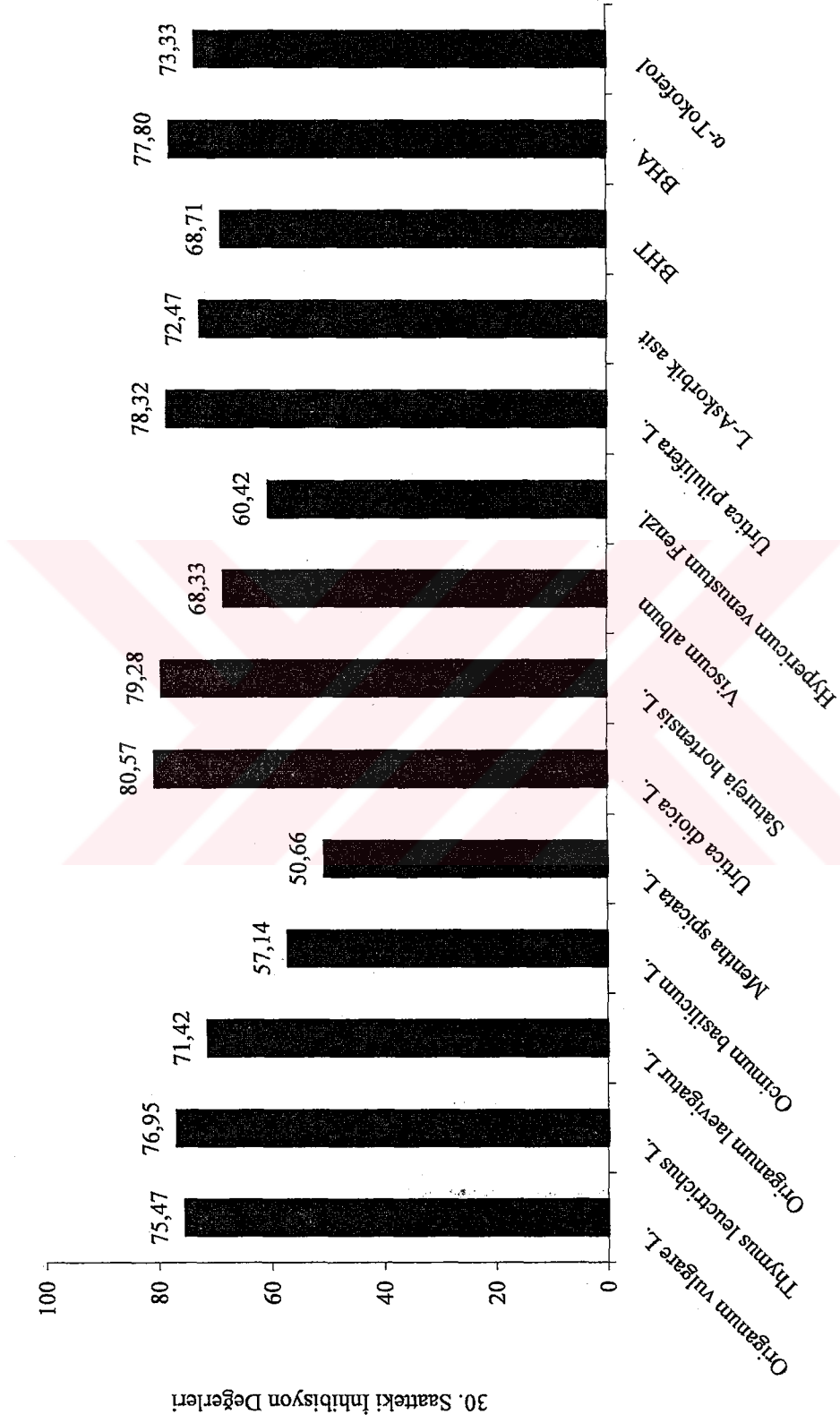
Ov: *Origanum vulgare* L.Ti: *Thymus leucotrichus* L.Ol: *Origanum laevigatum* L.Ms: *Mentha spicata* L.Ud: *Urtica dioica* L.Ob: *Ocimum basilicum* L.Sh: *Satureja hortensis* L.Va: *Viscum album* L.Hv: *Hypericum venustum* L.Up: *Urtica ptilifera* L.

Aa: L-Askorbik asit

Tk:  $\alpha$ -Tokoferol



Şekil 23. Bitkilerin antioksidant aktivitelerinin standart antioksidant maddelerle peroksidasyon düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 24. Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin 30. saat sonunda inhibisyon düzeylerinin karşılaştırılması



**Tablo 19.** Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivitelerinin 30. saatteki inhibisyon değerleri

<b>Örnek</b>	<b>30. Saatteki İnhibisyon Değerleri</b>
<i>Origanum vulgare</i> L.	75.47
<i>Thymus leucotrichus</i> L.	76.95
<i>Origanum laevigatum</i> L.	71.42
<i>Ocimum basilicum</i> L.	57.14
<i>Mentha spicata</i> L.	50.66
<i>Urtica dioica</i> L.	80.57
<i>Urtica pilulifera</i> L.	78.32
<i>Satureja hortensis</i> L.	79.28
<i>Viscum album</i> L.	68.33
<i>Hypericum venustum</i> Fenzl.	60.42
L-Askorbik Asit	72.47
$\alpha$ -Tokoferol	73.33
BHT	68.71
BHA	77.80

Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin dağılımı Sapiro-Wilk normallik testi ile test edilerek sonuçların dağılımının normal olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin ortalamaları ve süreler arasında fark olup olmadığını anlamak için iki yönlü ANOVA testi yapıldı. Testte grupların birbirinden farklı olduğu anlaşıldı ( $p<0.05$ ). Sonuçlar Tablo 20 de özetlenmiştir.

**Tablo 20.** İki yönlü varyans (ANOVA) analizi sonucu

<b>Değişim Kaynağı</b>	<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F Değeri</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Süre (saat)</b>	11	2.778	0.253	9.43	0.00
<b>Grup</b>	14	7.228	0.516	19.28	0.00
<b>Hata</b>	154	4.124	0.027		
<b>Genel</b>	179	14.131			

Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerleri ve sürelerin (saat) birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey' in HSD testi yapıldı. Sonuçlar Tablo 21 ve 22 de özetlenmiştir.

Tablo 21. Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri

	K	Ov	Tl	Ol	Ob	Ms	Ud	Sh	Va	Hv	Up	Aa	BHT	BHA	Tk
K	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Ov	0.000**	-	1.000	1.000	0.071*	0.001**	0.999	1.000	0.981	0.897	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Tl	0.000**	1.000	-	1.000	0.041**	0.000**	1.000	1.000	0.950	0.812	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Ol	0.000**	1.000	1.000	-	0.297	0.007**	0.957	0.994	1.000	0.995	0.999	1.000	1.000	0.997	1.000
Ob	0.000**	0.071*	0.041*	0.274	-	0.999	0.001**	0.005**	0.894	0.980	0.010**	0.033*	0.431	0.006**	0.037
Ms	0.000**	0.001**	0.000**	0.007**	0.997	-	0.000**	0.000**	0.144	0.314	0.000**	0.000**	0.016*	0.000**	0.000**
Ud	0.000**	0.999	1.000	0.957	0.001**	0.000**	-	1.000	0.043*	0.022*	1.000	1.000	0.878	1.000	1.000
Sh	0.000**	1.000	1.000	0.994	0.005**	0.000**	1.000	-	0.647	0.395	1.000	1.000	0.973	1.000	1.000
Va	0.000**	0.981	0.950	1.000	0.894	0.144	0.405	0.647	-	1.000	0.706	0.932	1.000	0.696	0.942
Hp	0.000**	0.897	0.812	0.995	0.980	0.314	0.202	0.395	1.000	-	0.521	0.772	0.999	0.444	0.794
Up	0.000**	1.000	1.000	0.999	0.010**	0.000**	1.000	1.000	0.766	0.521	-	1.000	0.991	1.000	1.000
Aa	0.000**	1.000	1.000	1.000	0.033*	0.000**	1.000	1.000	0.932	0.772	1.000	-	1.000	1.000	1.000
BT	0.000**	1.000	1.000	1.000	0.431	0.016*	0.878	0.973	1.000	0.999	0.991	1.000	-	0.892	1.000
BA	0.000**	1.000	1.000	0.997	0.006**	0.000**	1.000	1.000	0.696	0.444	1.000	1.000	0.982	-	1.000
Tk	0.000**	1.000	1.000	1.000	0.037*	0.000**	1.000	1.000	0.942	0.794	1.000	1.000	1.000	1.000	-

K: Kontrol

Ob: *Ocimum basilicum* L.Sh: *Satureja hortensis* L.Up: *Urtica pilulifera* L.Ov: *Origanum vulgare* L.Ms: *Mentha spicata* L.Va: *Ysiscum album* L.

Aa: L-Askorbik asit

Tl: *Thymus leucotrichus* L.Ud: *Urtica dioica* L.Hv: *Hypericum venustum* Fenzl.Tk:  $\alpha$ -TokoferolOl: *Origanum laevigatum* L.\*Önemli; ( $\alpha=0.05$  için)  $p<0.05$ \*\*Çok önemli; ( $\alpha=0.01$  için)  $p<0.01$

**Tablo 22.** Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin antioksidant değerlerinin sürelerle (saat) bağlı ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri

	0. saat	3. saat	6. saat	9. saat	12. saat	15. saat	18. saat	21. saat	24. saat	27. saat	30. saat	33. saat
0. saat	-	1.000	0.997	0.808	0.487	0.140	0.012*	0.001**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
3. saat	1.000	-	1.000	0.991	0.896	0.510	0.095*	0.019*	0.003**	0.000**	0.000**	0.000**
6. saat	0.996	1.000	-	1.000	0.985	0.803	0.267	0.073*	0.016*	0.000**	0.000**	0.000**
9. saat	0.808	0.991	1.000	-	1.000	0.995	0.773	0.407	0.155	0.006**	0.001**	0.000**
12. saat	0.487	0.896	0.968	1.000	-	1.000	0.961	0.738	0.409	0.032*	0.009**	0.03**
15. saat	0.140	0.510	0.803	0.995	1.000	-	1.000	0.997	0.831	0.185	0.068*	0.027*
18. saat	0.012*	0.095*	0.267	0.773	0.961	1.000	-	1.000	0.998	0.699	0.426	0.246
21. saat	0.001**	0.019**	0.073*	0.407	0.738	0.977	1.000	-	1.000	0.948	0.770	0.594
24. saat	0.000**	0.003**	0.016*	0.155	0.409	0.831	0.998	1.000	-	0.998	0.966	0.879
27. saat	0.000**	0.000**	0.000**	0.005**	0.032*	0.185	0.694	0.948	0.998	-	1.000	1.000
30. saat	0.000**	0.000**	0.000**	0.001**	0.009**	0.068*	0.426	0.790	0.966	1.000	-	1.000
33. saat	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.003**	0.027*	0.246	0.594	0.879	1.000	1.000	-

\*Önemli; ( $\alpha=0.05$  için)  $p<0.05$       \*\*Çok önemli; ( $\alpha=0.01$  için)  $p<0.01$

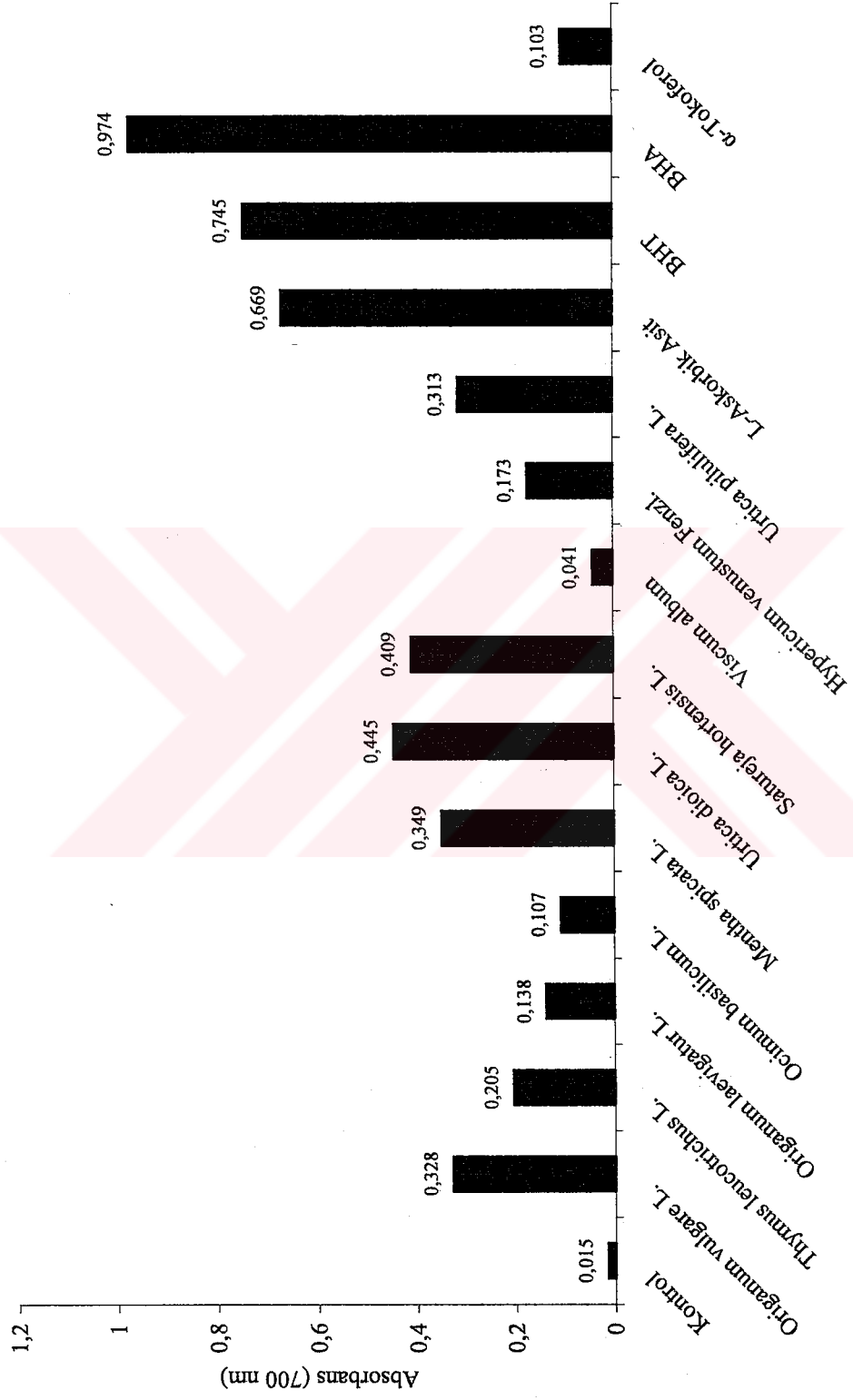
### 3.1.3. Bitkilerin İndirgeme Gücü

Çalışmada kullanılan bitkiler ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü Oyaizu Metodu' na göre tayin edildi. İndirgeme gücü; BHA > BHT > L-Askorbik asit > *Urtica dioica* L. > *Satureja hortensis* L. > *Mentha spicata* L. > *Origanum vulgare* L. > *Urtica pilulifera* L. > *Thymus leucotrichus* L. > *Hypericum venustum* Fenzl. > *Origanum laevigatum* L. > *Ocimum basilicum* L. >  $\alpha$ -Tokoferol > *Viscum album* L. > kontrol şeklinde değişmektedir.

Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin 700 nm' deki absorbans değerlerine göre; bitkilerden *Urtica dioica* L. ve standart antioksidant maddelerden BHA en yüksek indirgeme gücü değerini gösterdiler (Tablo 23 ve Şekil 25).

**Tablo 23.** Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivitelerinin indirgeme gücü değerleri

Örnek	Absorbans (700 nm) (İndirgeme Gücü)
Kontrol	0.015
<i>Origanum vulgare</i> L.	0.328
<i>Thymus leucotrichus</i> L.	0.205
<i>Origanum laevigatum</i> L.	0.138
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0.107
<i>Mentha spicata</i> L.	0.349
<i>Urtica dioica</i> L.	0.445
<i>Urtica pilulifera</i> L.	0.313
<i>Satureja hortensis</i> L.	0.409
<i>Viscum album</i> L.	0.041
<i>Hypericum venustum</i> Fenzl..	0.173
L-Askorbik Asit	0.669
$\alpha$ -Tokoferol	0.103
BHT	0.745
BHA	0.974



Şekil 25. Bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü karşılaştırma diyagramı

Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü değerlerinin ortalamaları arasında fark olup olmadığını anlamak için tek yönlü ANOVA testi yapıldı. Test sonucu grupların birbirinden farklı olduğu anlaşıldı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar Tablo 24 te özetlenmiştir.

**Tablo 24.** Tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonucu

<b>Değişim Kaynağı</b>	<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F Değeri</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Gruplar Arasında</b>	5.408	14	0.386	9701	0.00
<b>Gruplar İçinde</b>	$2.2 \times 10^{-3}$	60	$3.9 \times 10^{-5}$		
<b>Genel</b>	5.41	74			

Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücünün birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey' in HSD testi yapıldı. Sonuçlar Tablo 25 te özetlenmiştir.



Tablo 25. Kontrol, bitkiler ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü değerlerinin ortalamaların birbirleriyle çoklu karşılaştırılma değerleri

	K	Ov	Ti	Oi	Ob	Ms	Ud	Sh	Va	Hv	Up	Aa	BHT	BHA	Tk
K	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Ov	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.201	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Ti	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Oi	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Ob	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	1.000
Ms	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Ud	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Sh	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Va	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Hp	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Up	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
Aa	0.000**	0.201	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**	0.000**
BT	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**	0.000**
BA	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-	0.000**
Tk	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	1.000	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	-

K: Kontrol

Ov: *Origanum vulgare* L.

Ti: *Thymus leucotrichus* L.

Oi: *Origanum laevigatum* L.

\*Önemli; ( $\alpha=0.05$  için)  $p<0.05$

\*\*Çok önemli; ( $\alpha=0.01$  için)  $p<0.01$

Ob: *Ocimum basilicum* L.

Ms: *Mentha spicata* L.

Ud: *Urtica dioica* L.

Sh: *Satureja hortensis* L.

Va: *Viscum album* L.

Hp: *Hypericum venustum* Fenzl.

Up: *Urtica pilulifera* L.

Aa: L-Askorbik asit

Tk:  $\alpha$ -Tokoferol

### 3.2. *In vivo* Sonuçların Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarından her bir grupta sekiz adet (8-9 haftalık) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Kontrol grubu (Grup I), *Urtica dioica* L. ekstraktı iki farklı gruba 50 mg/kg vücut ağırlığı (Grup II) ve 100 mg/kg vücut ağırlığı (Grup III) dozlarda ağız yoluyla ve BHA grubuna (Grup IV) günlük verilen yem miktarının % 0.75 i kadar BHA yemine katılarak *in vivo* çalışmalar yapıldı.

Dört gruba ait deney hayvanlarının birinci gün vücut ağırlıkları ve ondördüncü günün sonundaki vücut ağırlıkları Tablo 26 da verilmiştir. *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktının uygulandığı gruplar ve BHA grubunda kontrole göre vücut ağırlıklarında değişim gözlenmemiştir.

**Tablo 26.** Deney hayvanlarının 0. ve 14. gün sonunda vücut ağırlıkları ortalaması

Grup	Uygulama	Vücut Ağırlığı	
		İlk ( 0. gün )	Son ( 14. gün )
I	Kontrol	28.24±2.62	31.07±2.43
	(yalnız destile su)	(1.000)*	(1.000)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	28.44±2.32	31.27±2.74
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.007)*	(1.006)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	28.80±2.62	31.22±2.66
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.019)*	(1.004)*
IV	BHA	28.61±2.37	30.83±1.95
	(% 0.75 + Yem)	(1.013)*	(0.992)*

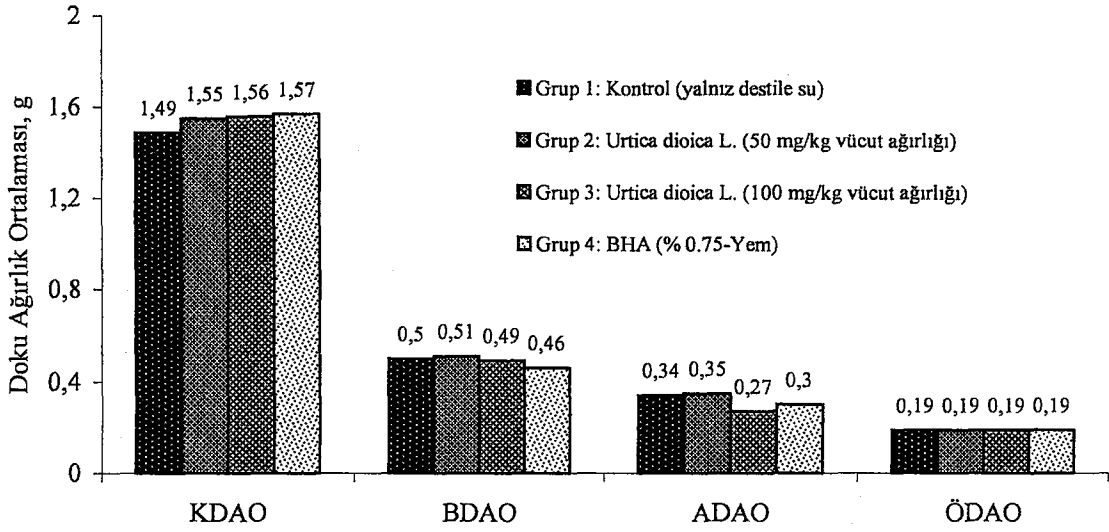
\*Kontrole bağlı değişim oranı

Perfüzyon işlemi yapılarak dört gruba ait deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus organları alındı. Organlar 0.15 M Tris-KCI tamponu ile yıkandı ve kromatografik buzdolabında (+4 °C) tartıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 27 de verilmiştir.

Karaciğer doku ağırlığı kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük ve yüksek dozunda 1.04 kat ve BHA grubunda 1.05 kat artmıştır (Şekil 26).

Böbrek doku ağırlığı kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.02 kat artmasına karşın, yüksek dozunda % 2 ve BHA grubunda % 8 azalmıştır (Şekil 26).

Akciğer doku ağırlığı kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.02 kat artmasına karşın, yüksek dozunda % 21 ve BHA grubunda % 12 azalmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. Karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus doku ağırlık ortalamasının dağılımı

Özofagus doku ağırlığı kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda, yüksek dozunda ve BHA grubunda değişmemiştir (Şekil 26).

İstatistiksel analiz sonucu, doku ağırlıkları arasında anlamlı değişim gözlenmemiştir ve kontrole göre ortalama değerler arasında anlamlı fark yoktur.

Tablo 27. Deney hayvanlarının 0. ve 14. gün sonunda karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus ağırlık ortalaması

Grup	Uygulama	KDAO	BDAO	ADAO	ÖDAO
I	Kontrol	1.49±0.13	0.50±0.11	0.34±0.08	0.19±0.02
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	1.55±0.07**	0.51±0.07**	0.35±0.15**	0.19±0.04**
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.04)*	(1.02)*	(1.02)*	(1.00)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	1.56±0.10**	0.49±0.05**	0.27±0.04**	0.19±0.04**
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.04)*	(0.98)*	(0.79)*	(1.00)*
IV	BHA	1.57±0.05#	0.46±0.06**	0.30±0.07**	0.19±0.03**
	(% 0.75-Yem)	(1.05)*	(0.92)*	(0.88)*	(1.00)*

\*Kontrole bağlı değişim oranı; \*\*anlamlı olmayan değer

KDAO: Karaciğer Doku Ağırlık Ortalaması; BDAO: Böbrek Doku Ağırlık Ortalaması

ADAO: Akciğer Doku Ağırlık Ortalaması; ÖDAO: Özofagus Doku Ağırlık Ortalaması

Ondördüncü günün sonunda alınan karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus organlarının vücut ağırlığına bağlı yüzde ağırlık ortalaması Tablo 28 de verilmiştir.

Karaciğer bağıl ağırlık ortalaması kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.03 kat, yüksek dozunda 1.04 kat ve BHA grubunda ise 1.05 kat artmış vardır (Şekil 27).

Böbrek bağıl ağırlık ortalaması kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 6, yüksek dozunda % 3 ve BHA grubunda ise % 6 azalmıştır (Şekil 27).

Akciğer bağıl ağırlık ortalaması kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 10, yüksek dozunda % 22 ve BHA grubunda ise % 10 azalmıştır (Şekil 27).

Özofagus bağıl ağırlık ortalaması kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda değişim gözlenmemesine karşın, yüksek dozunda % 2 azalma ve BHA grubunda 1.04 kat artış gözlemiştir (Şekil 27).

İstatistiksel analiz sonucu, son vücut ağırlığına bağlı karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus dokularının ağırlık ortalamaları arasında kontrole göre anlamlı fark yoktur.

**Tablo 28.** Deney hayvanlarına ait 0. ve 14. gün sonunda vücut ağırlığına bağlı karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus yüzde ağırlık ortalaması

Grup	Uygulama	KBA	BBA	ABA	ÖBA
I	Kontrol	4.84±0.59	1.60±0.31	1.09±0.25	0.61±0.07
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.000)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	5.00±0.44**	1.61±0.26**	0.99±0.29**	0.61±0.11**
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.03)*	(0.94)*	(0.90)*	(1.00)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	5.08±0.68**	1.56±0.23**	0.85±0.14**	0.60±0.15**
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.04)*	(0.97)*	(0.78)*	(0.98)*
IV	BHA	5.12±0.27**	1.51±0.22**	0.99±0.22**	0.64±0.09**
	(% 0.75 + Yem)	(1.05)*	(0.94)*	(0.90)*	(1.04)*

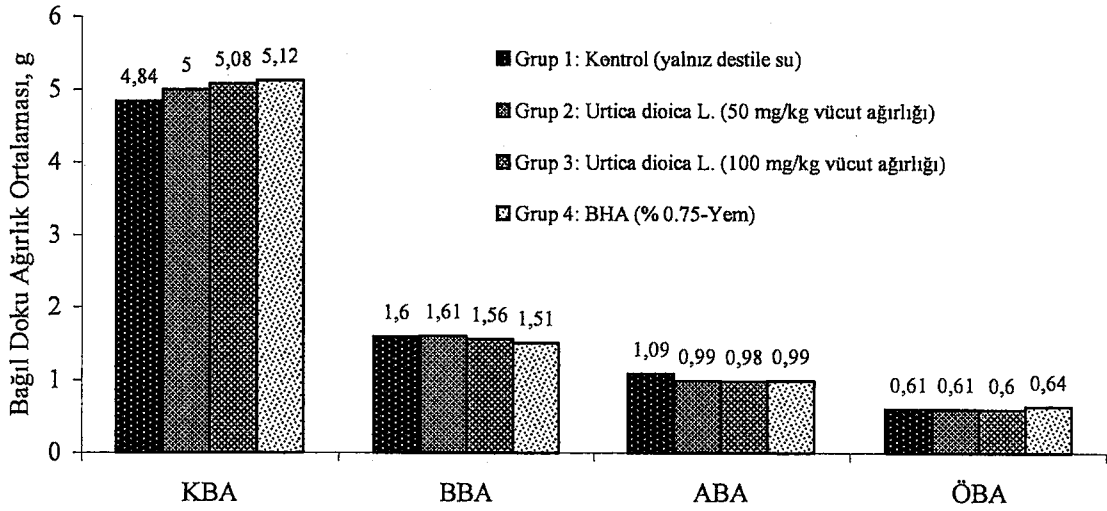
\*Kontrole bağıl değişim oranı ; \*\*anlamlı olmayan değer

**KBA:** Karaciğer Bağıl Ağırlığı, [(Karaciğer doku ağırlığı / son vücut ağırlığı) x 100]

**BBA:** Böbrek Bağıl Ağırlığı, [(Böbrek doku ağırlığı / son vücut ağırlığı) x 100]

**ABA:** Akciğer Bağıl Ağırlığı, [(Akciğer doku ağırlığı / son vücut ağırlığı) x 100]

**ÖBA:** Özofagus Bağıl Ağırlığı, [(Özofagus doku ağırlığı / son vücut ağırlığı) x 100]



Şekil 27. Karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus bağıl doku ağırlık ortalamasının dağılımı

### 3.2.1. Deney Hayvanlarının Hepatik Mikrozomal, Hepatik Sitozolik, Böbrek Sitozolik, Akciğer Sitozolik ve Özofagus Sitozolik Hücre Fraksiyonlarının Protein İçeriği

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerden uygun homojenizasyon ve santrifügasyon ile elde edilen mikrozomal ve sitozolik fraksiyonların protein içeriği Tablo 29 da verilmiştir. Mikrozomal ve sitozolik protein içeriğindeki azalma *Urtica dioica* L. uygulanan gruplarında gözlenmiştir. Deney grupları arasında hepatik mikrozomal protein içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 9 azalma gözlenmesine karşın yüksek dozunda 1.01 kat ve BHA grubunda 1.03 kat artmıştır. Deney grupları arasında hepatik sitozolik protein içeriğinde kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 8 ve yüksek dozunda % 20 azalma olmasına karşın BHA grubunda 1.09 kat artış gözlenmiştir (Şekil 28).

Karaciğer mikrozomlarındaki protein içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=2.514 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.007$  ve  $\alpha=0.01$  için fark vardır. I. grupla, III. grup ve IV. grup arasında fark yoktur.

Karaciğer sitozolündeki protein içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=4.33 \times 10^{-9}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=1.05 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.011$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan böbreklerden uygun homojenizasyon ve santrifügasyon ile elde edilen sitozolik fraksiyonların protein içeriği Tablo 29 da verilmiştir.

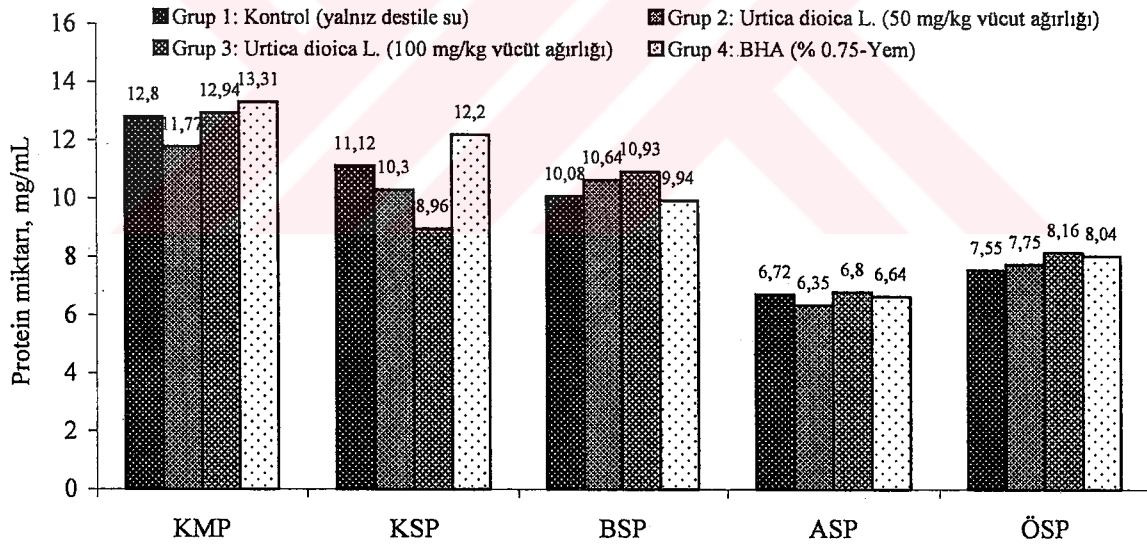


*Urtica dioica* L. uygulanan gruplar arasında protein içeriğinde artma eğilimi gözlenmiştir. Deney grupları arasında sitozolik protein içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nın düşük dozunda 1.05 kat ve yüksek dozunda 1.08 kat artmış olmasına karşın BHA grubu % 2 azalmıştır (Şekil 28).

Böbrek sitozolündeki protein içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.002$  ve  $\alpha=0.005$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=0.007$  ve  $\alpha=0.01$  için fark vardır. I. grup, II. grup ve IV. grup arasında fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan akciğerlerden uygun homojenizasyon ve santrifügasyon ile elde edilen akciğer sitozolik fraksiyonlarının protein içeriği Tablo 29 da verilmiştir. Deney grupları arasında sitozolik protein içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nın yüksek dozunda sitozolik protein içeriği 1.01 kat artmasına karşın düşük dozunda % 6 lık ve BHA grubunda % 2 lik azalma olmuştur (Şekil 28).

Akciğer sitozolündeki protein içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.079$  ve  $\alpha=0.05$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup, II. grup, III. grup, IV. grup arasında fark yoktur.



**Şekil 28.** Dört gruba ait karaciğer mikrozomal (KMP), sitozolik (KSP), böbrek sitozolik (BSP), akciğer sitozolik (ASP) ve özofagus sitozolik (ÖSP) protein içeriklerinin dağılımı

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan özofagustan uygun homojenizasyon ve santrifügasyon ile elde edilen özofagus sitozolik fraksiyonlarının protein içeriği Tablo 29 da verilmiştir. Deney grupları arasında sitozolik protein içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nın düşük dozunda 1.02 kat, yüksek dozunda 1.08 kat ve BHA uygulanan grupta ise, 1.06 kat artmıştır (Şekil 28).



Özofagus sitozolündeki protein içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.005$  ve  $\alpha=0.01$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=0.003$  ve  $\alpha=0.005$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.019$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır.

**Tablo 29.** Deney hayvanlarının hepatik mikrozomal, hepatik sitozolik, böbrek sitozolik, akciğer sitozolik ve özofagus sitozolik hücre fraksiyonlarının protein içeriği

Grup	Uygulama	Protein Miktarı (mg/mL)				
		KMP	KSP	BSP	ASP	ÖSP
I	Kontrol	12.80±0.42	11.12±0.69	10.08±0.35	6.72±0.22	7.55±0.22
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	11.77±0.48 <sup>a</sup>	10.30±0.66**	10.64±0.67**	6.35±0.26**	7.75±0.35**
	(50 mg/kg v.ağ.)	(0.91)*	(0.92)*	(1.05)*	(0.94)*	(1.02)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	12.94±0.85**	8.96±0.42 <sup>c</sup>	10.93±0.30 <sup>a</sup>	6.80±0.25**	8.16±0.35 <sup>d</sup>
	(100 mg/kg v. ağ.)	(1.01)*	(0.80)*	(1.08)*	(1.01)*	(1.08)*
IV	BHA	13.31±0.43**	12.20±0.75 <sup>b</sup>	9.94±0.51**	6.64±0.30**	8.04±0.30 <sup>b</sup>
	(% 0.75 + Yem)	(1.03)*	(1.09)*	(0.98)*	(0.98)*	(1.06)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrolle bağlı değişim oranı; \*\*anlamlı olmayan değer

KMP: Karaciğer Mikrozomal Protein; KSP: Karaciğer Sitosolik Protein

BSP: Böbrek Sitosolik Protein; ASP: Akciğer Sitosolik Protein; ÖSP: Özofagus Sitosolik Protein

### 3.2.2. Antioksidant Enzimler

#### 3.2.2.1. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitosolünde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan süperoksit dismutaz aktivitesi değerleri Tablo 30 da verilmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.33 kat, yüksek dozunda 1.60 kat ve BHA grubunda ise 1.20 kat artmıştır (Şekil 29).

Süperoksit dismutaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.095 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=1.4 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.005$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.169 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.064$  için fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan böbreklerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra böbrek sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan süperoksit dismutaz aktivitesi değerleri Tablo 30 da verilmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.29 kat, yüksek dozunda 1.32 kat ve BHA grubunda ise 1.12 kat artmıştır (Şekil 29).

Süperoksit dismutaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.039$  ve  $\alpha=0.05$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.053$  için fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=0.035$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.66$  için fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan akciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra akciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan süperoksit dismutaz aktivitesi değerleri Tablo 30 da verilmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.39 kat, yüksek dozunda 1.45 kat ve BHA grubunda ise 1.47 kat artmıştır (Şekil 29).

Süperoksit dismutaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=7.5 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.005$  ve  $\alpha=0,01$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=1.39 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.01$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=8.5 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan özofagus organlarının uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra özofagus sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan süperoksit dismutaz aktivitesi değerleri Tablo 30 da verilmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.16 kat, yüksek dozda 1.61 kat ve BHA grubunda ise 1.89 kat artmıştır (Şekil 29).

Süperoksit dismutaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=7.347 \times 10^{-7}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.54$  için fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.5 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=8.7 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

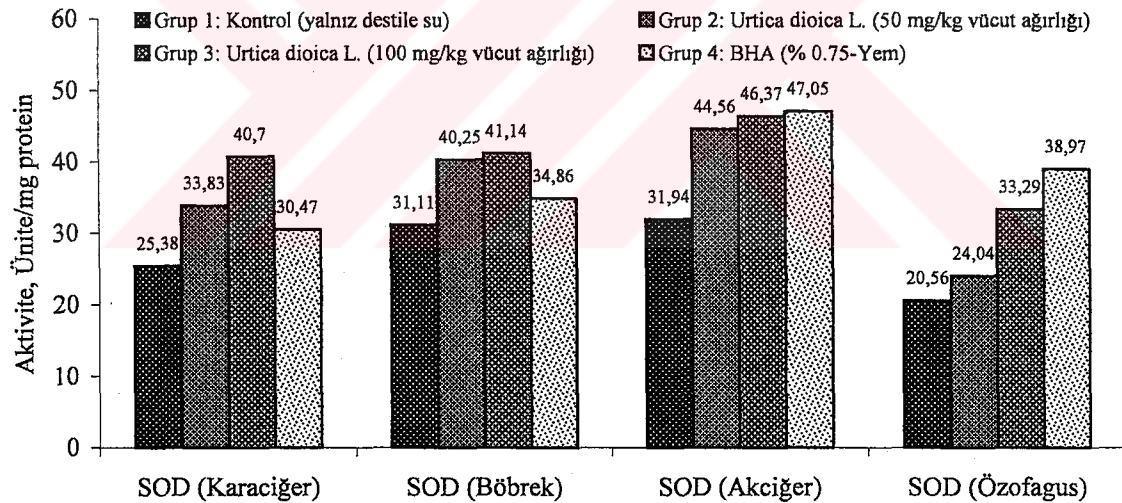
**Tablo 30.** Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde süperoksit dismutaz aktiviteleri

Grup	Uygulama	SOD Karaciğer (A)	SOD Böbrek (A)	SOD Akciğer (A)	SOD Özofagus (A)
I	Kontrol	25.38±3.39	31.11±3.93	31.94±4.01	20.56±4.44
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	33.83±4.16 <sup>d</sup>	40.25±9.36**	44.56±8.30 <sup>a</sup>	24.04±4.99**
	(50 mg/kg vücut ağı.)	(1.33)*	(1.29)*	(1.39)*	(1.16)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	40.70±3.43 <sup>c</sup>	41.14±9.26 <sup>b</sup>	46.37±8.69 <sup>a</sup>	33.29±6.60 <sup>c</sup>
	(100 mg/kg vücut ağı.)	(1.60)*	(1.32)*	(1.45)*	(1.61)*
IV	BHA	30.47±4.88**	34.86±3.68**	47.05±5.14 <sup>c</sup>	38.97±3.19 <sup>c</sup>
	(% 0.75 + Yem)	(1.20)*	(1.12)*	(1.47)*	(1.89)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrolle bağlı değişim oranı; \*\*anlamli olmayan değer

A: Ünite/mg sitozolik protein



**Şekil 29.** Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer özofagus sitozolik süperoksit dismutaz aktivitesinin dağılımı

### 3.2.2.2. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitozolünde Katalaz (KAT) Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruptan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş katalaz aktivitesi değerleri Tablo 31 de verilmiştir. Katalaz aktivitesinde kontrole

göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.07 kat ve yüksek dozunda 1.28 kat artış gözlenmesine karşın, BHA grubunda % 9 azalmıştır (Şekil 30).

Katalaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=8.03 \times 10^{-8}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.203$  için fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=1.07 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.21$  için fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan böbreklerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra böbrek sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan katalaz aktivitesi değerleri Tablo 31 de verilmiştir. Katalaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.02 kat, yüksek dozunda 1.04 kat ve BHA grubunda ise 1.14 kat artmıştır (Şekil30).

Katalaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.116$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark yoktur. I. , II. , III. ve IV. gruplar arasında fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan akciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra akciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan katalaz aktivitesi değerleri Tablo 31 de verilmiştir. Katalaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.64 kat, yüksek dozunda 1.69 kat ve BHA grubunda ise 1.81 artmıştır (Şekil 30).

Katalaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=2.096 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=7.153 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=1.404 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan özofagus organlarının uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra özofagus sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan katalaz aktivitesi değerleri Tablo 31 de verilmiştir. Katalaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 2.31 kat, yüksek dozunda 2.61 kat ve BHA grubunda ise 3.84 kat artmıştır (Şekil 30).

Katalaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=2.77 \times 10^{-11}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=2.57 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.467 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

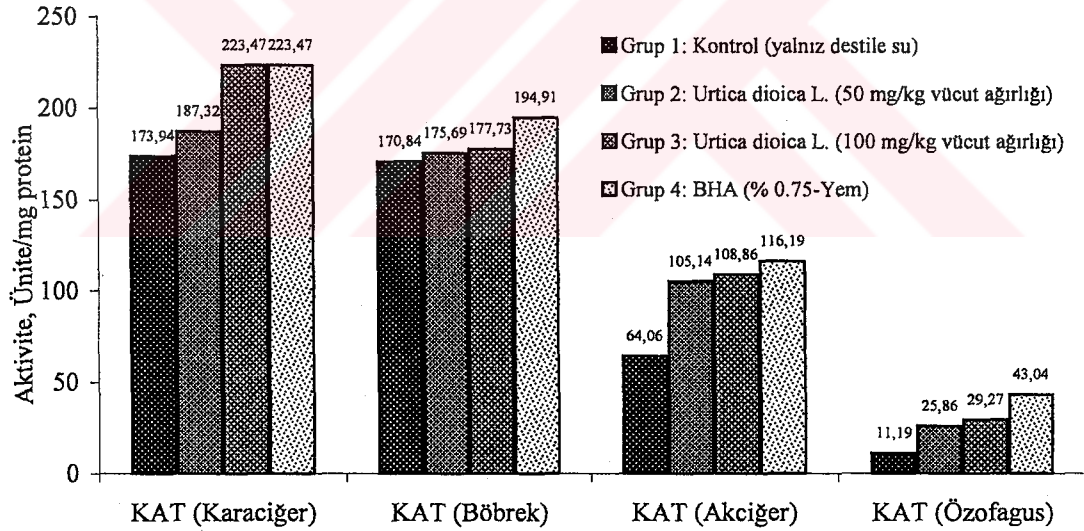
**Tablo 31.** Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde katalaz aktiviteleri

Grup	Uygulama	KAT Karaciğer (A)	KAT Böbrek (A)	KAT Akciğer (A)	KAT Özofagus (A)
I	Kontrol	173.94±5.69	170.84±3.98	64.06±2.13	11.19±3.47
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	187.32±8.24**	175.69±4.82**	105.14±8.15 <sup>c</sup>	25.86±3.29 <sup>c</sup>
	(50 mg/kg vücut ağı.)	(1.07)*	(1.02)*	(1.64)*	(2.31)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	223.47±8.78 <sup>c</sup>	177.73±4.99**	108.86±9.33 <sup>c</sup>	29.27±5.67 <sup>c</sup>
	(100 mg/kg vücut ağı.)	(1.28)*	(1.04)*	(1.69)*	(2.61)
IV	BHA	159.98±9.72**	194.91±6.54**	116.19±4.97 <sup>c</sup>	43.04±5.35 <sup>c</sup>
	(% 0.75-Yem)	(0.91)*	(1.14)*	(1.81)*	(3.84)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrolle bağlı değişim oranı; \*\*anlamli olmayan değer

A: Ünite/mg sitozolik protein



**Şekil 30.** Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer özofagus sitozolik katalaz aktivitesinin dağılımı

### 3.2.2.3. Deney hayvanlarının Karaciğer Sitozolünde Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifüjasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz aktivitesi değerleri Tablo 32 de



verilmiştir. Glutasyon redüktaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.07 kat, yüksek dozunda 1.09 kat ve BHA grubunda ise 1.16 kat artmıştır (Şekil 31).

**Tablo 32.** Deney hayvanlarının karaciğer sitozolünde glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz aktiviteleri

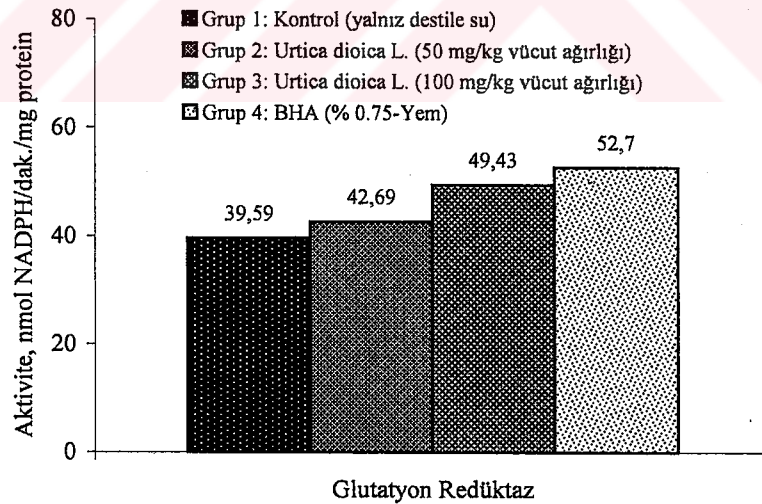
Grup	Uygulama	GR (A)	GPx (B)
I	Kontrol	39.59±4.83	29.49±8.76
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	42.69±6.88**	47.52±6.65**
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.07)*	(1.61)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	49.43±4.70 <sup>c</sup>	75.39±3.53 <sup>c</sup>
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.09)*	(2.55)*
IV	BHA	52.70±5.72 <sup>c</sup>	34.97±7.23**
	(% 0.75-Yem)	(1.16)*	(1.18)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrole bağlı değişim oranı; \*\*anlamli olmayan değer

A: nmol NADPH/dak/mg protein;

B: nmol GSH /dak/mg protein



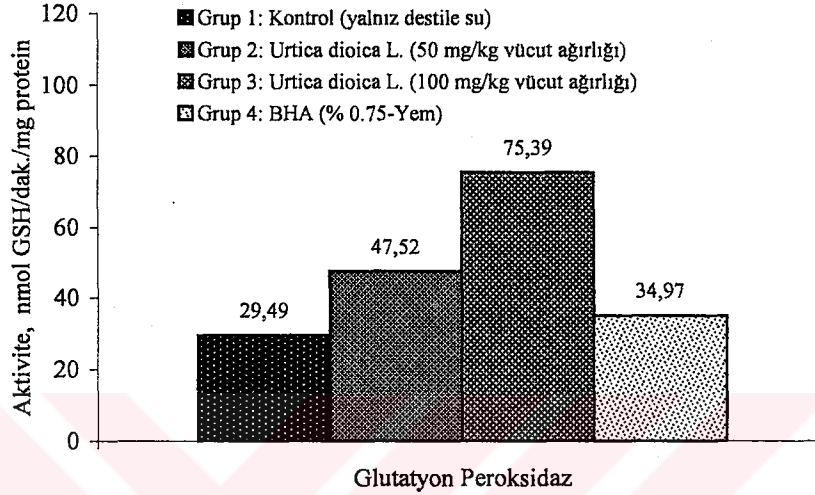
**Şekil 31.** Dört gruba ait karaciğer sitozolünde glutasyon redüktaz aktivitesinin dağılımı

Glutasyon redüktaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=4.9 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.607$  için fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.0 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.01$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=4.4 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.



Glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.61 kat, yüksek dozda 2.55 kat ve BHA grubunda ise 1.18 kat artmıştır (Şekil 32).

Glutasyon peroksidaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=6.9369 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.051$  için fark yoktur. I. grup ve III. arasında  $p=3.83 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.594$  için fark yoktur.



Şekil 32. Dört gruba ait karaciğer sitozolünde glutasyon peroksidaz aktivitesinin dağılımı

### 3.2.3. Deney Hayvanlarının Karaciğer Doku Homojenatında Toplam Sülfidril (T-SH), Proteik Olmayan Sülfidril (NP-SH) ve Proteik Bağlı Sülfidril Gruplarının (PB-SH) Tayini

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğer dokuları uygun homojenizasyon işlemi yapıldıktan sonra doku homojenatında spektrofotometrik olarak tayin edilmiş toplam sülfidril, proteik olmayan sülfidril ve proteik bağlı sülfidril gruplarının değerleri Tablo 33 te verilmiştir.

Karaciğer doku homojenatındaki toplam sülfidril grupları içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 5 ve yüksek dozunda % 36 azalmasına karşın BHA grubunda 1.27 kat artmıştır (Şekil 33).

Karaciğer doku homojenatındaki proteik olmayan sülfidril grupları kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.04 kat ve BHA grubunda 2.53 kat artmasına karşın yüksek dozunda % 31 azalmıştır (Şekil 33).

Karaciğer doku homojenatındaki proteik bağlı sülfidril grupları kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 20, yüksek dozunda % 37 ve BHA grubunda ise %

11 azalmıştır (Şekil 33).

T-SH için yapılan DUNNET t-testinde  $p=2.62 \times 10^{-11}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=0.01$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.85 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=5.80 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

NP-SH için yapılan DUNNET t-testinde  $p=9.003 \times 10^{-15}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup, II. grup ve III. grup arasında fark yoktur. I. grup ve IV. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

PB-SH için yapılan DUNNET t-testinde  $p=0.025$  ve  $\alpha=0.05$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup, II. grup ve IV. grup arasında fark yoktur. I. grup ve III. grup arasında  $p=0.009$  ve  $\alpha=0.01$  için fark vardır.

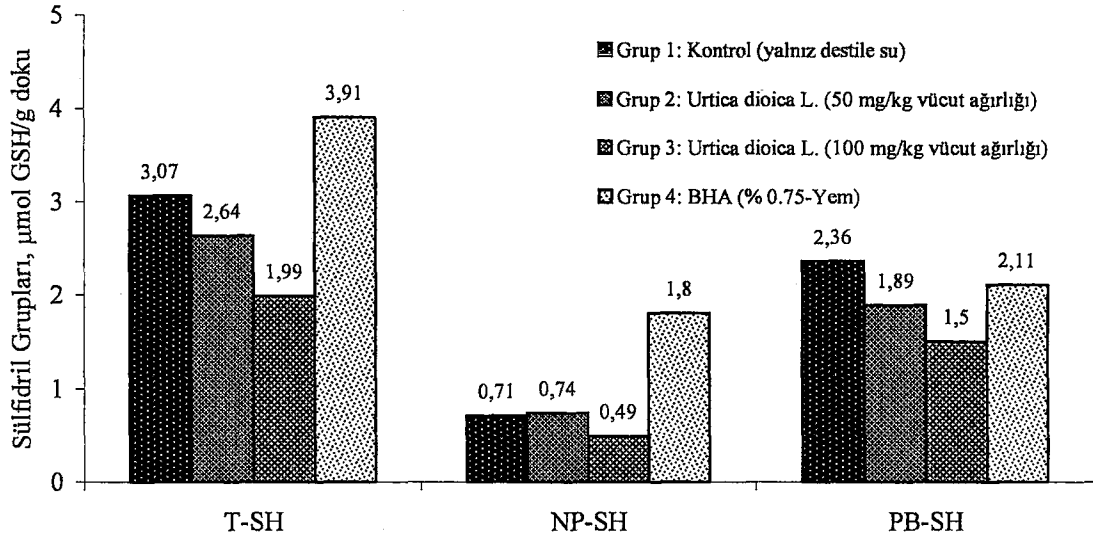
**Tablo 33.** Deney hayvanlarının karaciğer doku homojenatında toplam sülfidril (T-SH), proteik olmayan sülfidril (NP-SH) ve proteik bağlı sülfidril (PB-SH) grupları

Grup	Uygulama	(T-SH) (A)	(PB-SH) (A)	(PB-SH) (A)
I	Kontrol	3.07±0.40	0.71±0.13	2.36±0.33
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica L.</i>	2.64±0.36 <sup>b</sup>	0.74±0.11**	1.89±0.43**
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(0.95)*	(1.04)*	(0.80)*
III	<i>Urtica dioica L.</i>	1.99±0.22 <sup>d</sup>	0.49±0.18**	1.50±0.34 <sup>a</sup>
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(0.64)*	(0.69)*	(0.63)*
IV	BHA	3.91±0.16 <sup>d</sup>	1.80±0.18 <sup>d</sup>	2.11±0.24**
	(% 0.75 + Yem)	(1.27)*	(2.53)*	(0.89)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrole bağlı değişim oranı; \*\*anlamlı olmayan değer

A:  $\mu\text{mol GSH/g}$  doku ağırlığı



Şekil 33. Dört gruba ait karaciğer doku homojenatındaki toplam sülfidril (T-SH), proteik olmayan sülfidril (NP-SH) ve proteik bağlı sülfidril gruplarının (PB-SH) dağılımı

### 3.2.4. İlaç Metabolize Eden Enzimler

#### 3.2.4.1. Faz I Enzimler

##### 3.2.4.1.1. Deney Hayvanlarının Karaciğer Mikrozomlarında Sitokrom P450 (cyt P450) ve Sitokrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>) İçeriği

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer mikrozomlarının spektrofotometrik olarak tayin edilmiş cyt P450 ve cyt b<sub>5</sub> içeriği değerleri Tablo 34 te verilmiştir.

Tablo 34. Deney hayvanlarının hepatik hücre fraksiyonlarının cyt P450 ve cyt b<sub>5</sub> içeriği

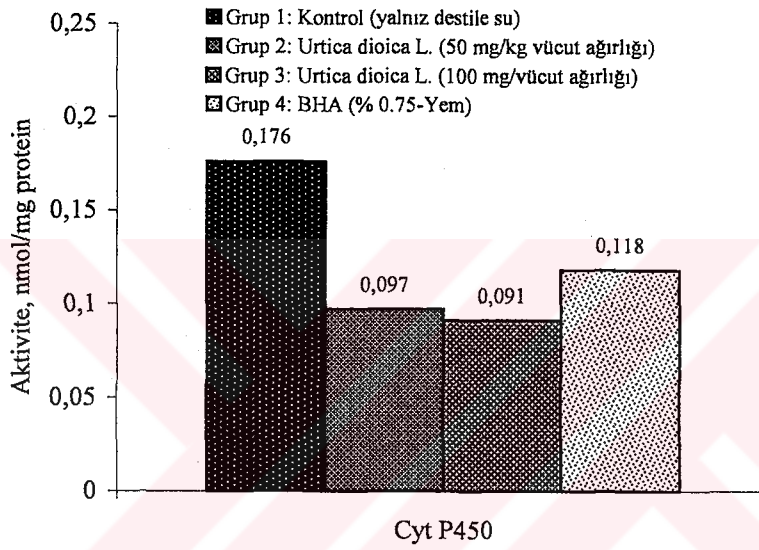
Grup	Uygulama	Cyt P450 (A)	Cyt b <sub>5</sub> (A)
I	Kontrol	0.176±0.022	0.524±0.109
	(yalnız destile su)	(1.000)*	(1.000)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	0.097±0.015 <sup>c</sup>	1.012±0.199 <sup>c</sup>
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(0.551)*	(1.931)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	0.091±0.023 <sup>c</sup>	0.886±0.085 <sup>c</sup>
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(0.517)*	(1.690)*
IV	BHA	0.118±0.022 <sup>c</sup>	1.020±0.092 <sup>c</sup>
	(% 0.75-Yem)	(0.670)*	(1.946)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrolle bağlı değişim oranı; A: nmol/mg mikrozomal protein

Cyt P450 ve cyt b<sub>5</sub> “hem” proteinleri *Urtica dioica* L. nin iki farklı dozu ve BHA grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Hepatik cyt P450 içeriğinde değişim gözlenmemiştir. Cyt P450 içeriğinde kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin düşük dozunda % 45, yüksek dozunda % 49 ve BHA grubu ise % 33 azalmıştır (Şekil 34).

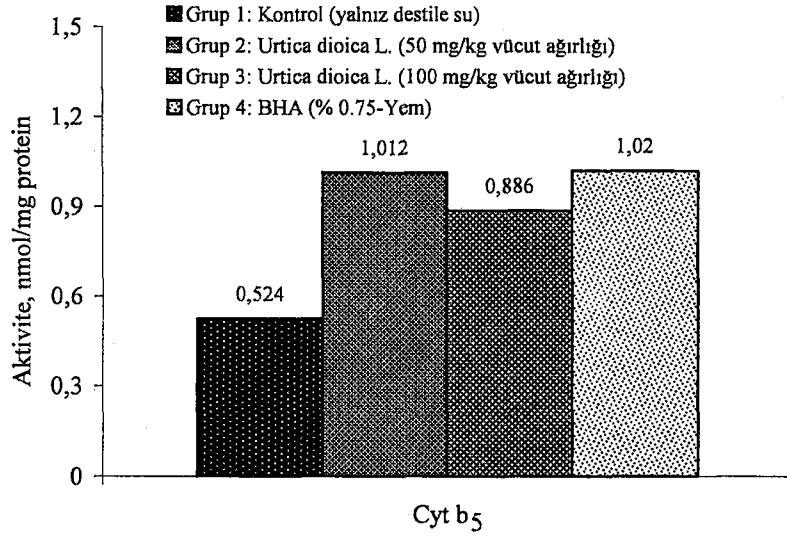
Cyt P450 içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.57 \times 10^{-9}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=8.60 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=8.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=1.128 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.



Şekil 34. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt P450 içeriğinin dağılımı

Cyt b<sub>5</sub> içeriğinde *Urtica dioica* L. nin düşük dozunda kontrol grubuna göre değişim gözlenmiştir. Cyt b<sub>5</sub> içeriği kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.93 kat, yüksek dozunda 1.69 kat ve BHA grubunda ise 1.94 kat artmıştır (Şekil 35).

Cyt b<sub>5</sub> içeriği için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.22 \times 10^{-7}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=8.25 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=5.30 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. arasında  $p=8.13 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.



Şekil 35. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt b<sub>5</sub> içeriğinin dağılımı

### 3.2.4.1.2. Deney Hayvanlarının Karaciğer Mikrozomlarında NADPH-Bağımlı Cyt P450 Redüktaz (cyt P450 R) ve NADH-Bağımlı Cyt b<sub>5</sub> Redüktaz (cyt b<sub>5</sub> R) Aktiviteleri

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer mikrozomlarında spektrofotometrik olarak tayin edilmiş cyt P450 R ve cyt b<sub>5</sub> R aktiviteleri değerleri Tablo 35 te verilmiştir.

Tablo 35. Deney hayvanlarının hepatik hücre fraksiyonlarının cyt P450 R ve cyt b<sub>5</sub> R aktivitesi

Grup	Uygulama	Cyt P450 R (A)	Cyt b <sub>5</sub> R (B)
I	Kontrol (yalnız destile su)	0.048±0.003 (1.000)*	0.844±0.056 (1.000)*
II	<i>Urtica dioica</i> L. (50 mg/kg vücut ağırlığı)	0.041±0.003 <sup>d</sup> (0.859)*	1.708±0.091 <sup>c</sup> (2.023)*
III	<i>Urtica dioica</i> L. (100 mg/kg vücut ağırlığı)	0.019±0.004 <sup>c</sup> (0.406)*	1.217±0.114 <sup>c</sup> (1.441)*
IV	BHA (% 0.75 + Yem)	0.0311±0.002 <sup>c</sup> (0.641)*	0.668±0.037 <sup>c</sup> (0.791)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

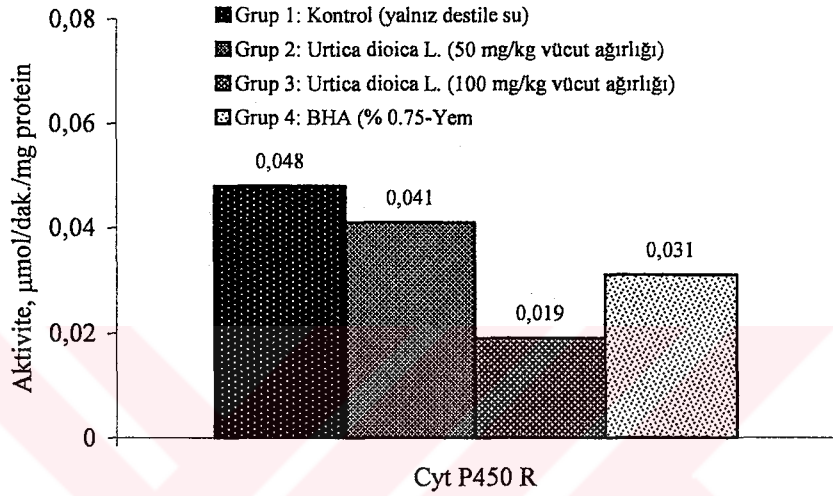
\*kontrolle bağlı değişim oranı

A:  $\mu\text{mol NADPH/dak./mg}$  mikrozomal protein

B:  $\mu\text{mol NADH/dak./mg}$  mikrozomal protein

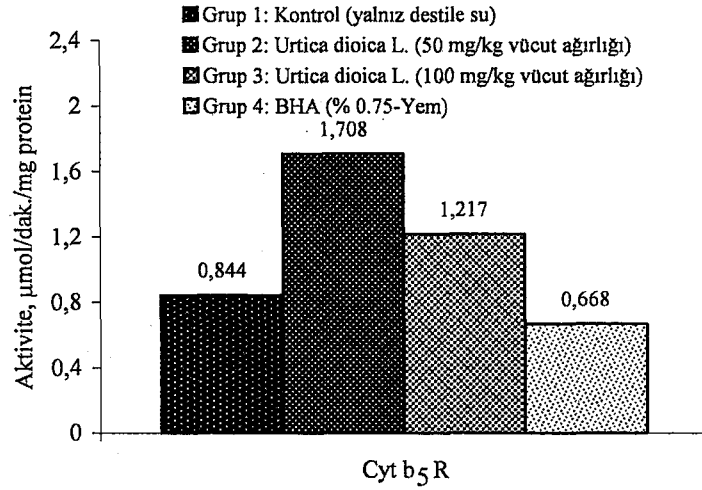
Hepatik NADPH-bağımlı cyt P450 redüktaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin düşük dozunda % 15, yüksek dozunda % 60 ve BHA grubunda ise % 36 azalmıştır (Şekil 36).

Cyt P450 R için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.00 \times 10^{-14}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=4.0 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.005$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.



Şekil 36. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt P450 R aktivitesinin dağılımı

Hepatik NADH-bağımlı cyt b<sub>5</sub> redüktaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulana düşük dozunda 2.02 kat, yüksek dozunda 1.44 kat artmasına karşın BHA grubu % 21 azalmıştır (Şekil 37).



Şekil 37. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında cyt b<sub>5</sub> R aktivitesinin dağılımı



Cyt b<sub>5</sub> R için yapılan DUNNET t-testinde  $p=9.20 \times 10^{-20}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.005$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=7.916 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=9.3 \times 10^{-4}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

### 3.2.4.2. Faz II Enzimler

#### 3.2.4.2.1. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitozolünde DT-diafosforaz Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan DT-diafosforaz aktivitesi değerleri Tablo 36 da verilmiştir. *Urtica dioica* L. uygulanan gruplarda DT-diafosforaz aktivitesi doza bağlı olarak artmıştır. DT-diafosforaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nın düşük dozunda 1.03 kat, yüksek dozunda 1.15 kat ve BHA grubunda ise 1.34 kat artmıştır (Şekil 38).

DT-diafosforaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=7.002 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup, II. ve III. grup arasında fark yoktur. I. grup ve IV. arasında  $p=1.67 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan böbreklerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra böbrek sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş DT-diafosforaz aktivitesi değerleri Tablo 36 da verilmiştir. DT-diafosforaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. uygulanan düşük dozunda % 44 ve yüksek dozunda % 33 azalmasına karşın BHA grubu 1.63 kat artmıştır (Şekil 38).

DT-diafosforaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.15 \times 10^{-10}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=1.00 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. arasında  $p=1.12 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır. I. grup ve IV. arasında  $p=1.23 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan akciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra akciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş DT-diafosforaz aktivitesi değerleri Tablo 36 da verilmiştir. DT-diafosforaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. uygulanan düşük dozunda 1.04 kat, yüksek dozunda 1.08 kat ve BHA grubunda ise 1.52 kat artmıştır (Şekil 38).



DT-diafosforaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.019 \times 10^{-8}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I.grup II. ve III. grup arasında fark yoktur. I. grup ve IV. arasında  $p=7.92 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruptan alınan özofaguslar uygun homojenizasyon ve santrifügasyon işlemlerinden sonra özofagus sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş DT-diafosforaz aktivitesi değerleri Tablo 36 da verilmiştir. DT-diafosforaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 2.65 kat, yüksek dozunda 1.84 kat ve BHA grubunda ise 2.41 kat artmıştır (Şekil 38).

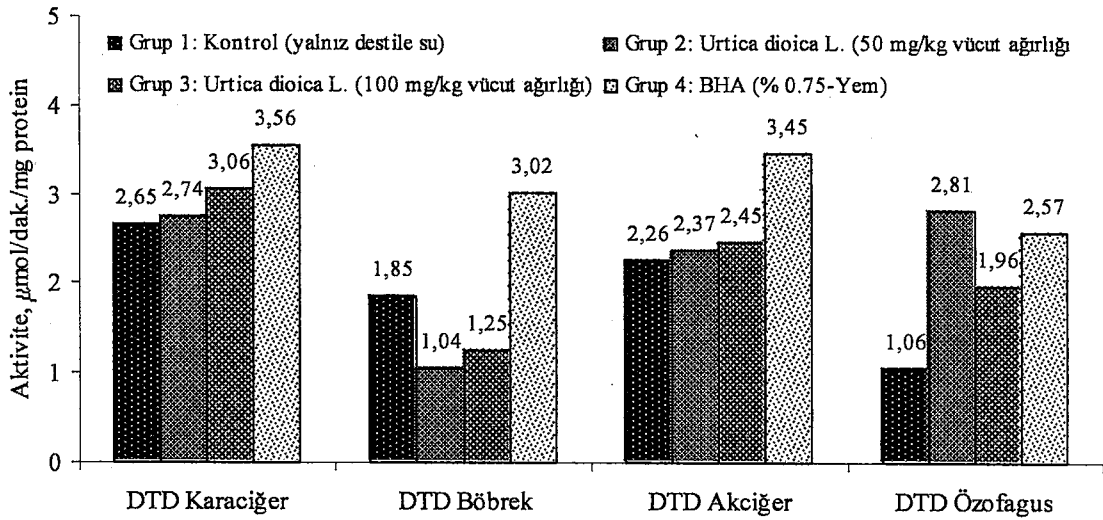
**Tablo 36.** Deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolik DT-diafosforaz aktivitesi

Grup	Uygulama	DTD Karaciğer (A)	DTD Böbrek (A)	DTD Akciğer (A)	DTD Özofagus (A)
I	Kontrol (yalnız destile su)	2.65±0.22 (1.00)*	1.85±0.52 (1.00)*	2.26±0.46 (1.00)*	1.06±0.07 (1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L. (50 mg/kg vücut ağırlığı)	2.74±0.2** (1.03)*	1.04±0.25 <sup>c</sup> (0.56)*	2.30±0.23** (1.04)*	2.81±0.29 <sup>c</sup> (2.65)
III	<i>Urtica dioica</i> L. (100 mg/kg vücut ağırlığı)	3.06±0.39** (1.15)*	1.25±0.21 <sup>b</sup> (0.67)*	2.45±0.14** (1.08)*	1.96±0.17 <sup>c</sup> (1.84)*
IV	BHA (% 0.75 + Yem)	3.56±0.12 <sup>c</sup> (1.34)*	3.02±0.36 <sup>c</sup> (1.63)*	3.45±0.07 <sup>c</sup> (1.52)*	2.57±0.27 <sup>c</sup> (2.41)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrole bağlı değişim oranı; \*\*anlamlı olmayan değer;

A: nmol /dak./mg sitozolik protein



**Şekil 38.** Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde DT-diafosforaz aktivitesinin dağılımı

DT-diafosforaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=3.14 \times 10^{-14}$  ve  $\alpha=0.001$  için kontrole göre gruplar arasında anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. arasında  $p=8.00 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

### 3.2.4.2.2. Deney Hayvanlarının Karaciğer, Böbrek, Akciğer ve Özofagus Sitolünde Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş glutasyon S-transferaz aktivitesi değerleri Tablo 37 de verilmiştir. Glutasyon S-transferaz aktivitelerinde *Urtica dioica* L. uygulanan gruplarda artış gözlenmiştir. Glutasyon S-transferaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.23 kat ve yüksek dozunda 1.16 kat artmasına karşın. BHA grubunda % 4 azalmıştır (Şekil 39).

GST için yapılan DUNNET t-testinde  $p=9.72 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=3.00 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.005$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=2.4 \times 10^{-2}$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında fark yoktur.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan böbreklerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra böbrek sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş glutasyon S-transferaz aktivitesi değerleri Tablo 37 de verilmiştir. Glutasyon S-transferaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 25 ve yüksek dozunda % 35 azalma gözlenmesine karşın BHA grubu 1.19 kat artmıştır (Şekil 39).

GST için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.99 \times 10^{-15}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=8.19 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=1.66 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan akciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra akciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş glutasyon S-transferaz aktivite değerleri Tablo 37 de verilmiştir. Glutasyon S-Transferaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. uygulanan düşük dozunda % 6 ve yüksek dozunda % 9 azalmasına karşın BHA grubu 1.04 kat artmıştır (Şekil 39).

GST için yapılan DUNNET t-testinde  $p=1.00 \times 10^{-3}$  ve  $\alpha=0.005$  için kontrole göre gruplar arasında anlamlı fark vardır. I. grup, II. grup ve IV. grup arasında fark yoktur. I. grup ve III. arasında  $p=2.20 \times 10^{-2}$  ve  $\alpha=0.05$  için fark vardır.

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan özofagusların uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra özofagus sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan glutatyon S-transferaz aktivite değerleri Tablo 37 de verilmiştir. Glutatyon S-transferaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nın düşük dozunda 1.65 kat, yüksek dozunda 1.05 kat ve BHA grubunda ise 1.76 kat artmıştır (Şekil 39).

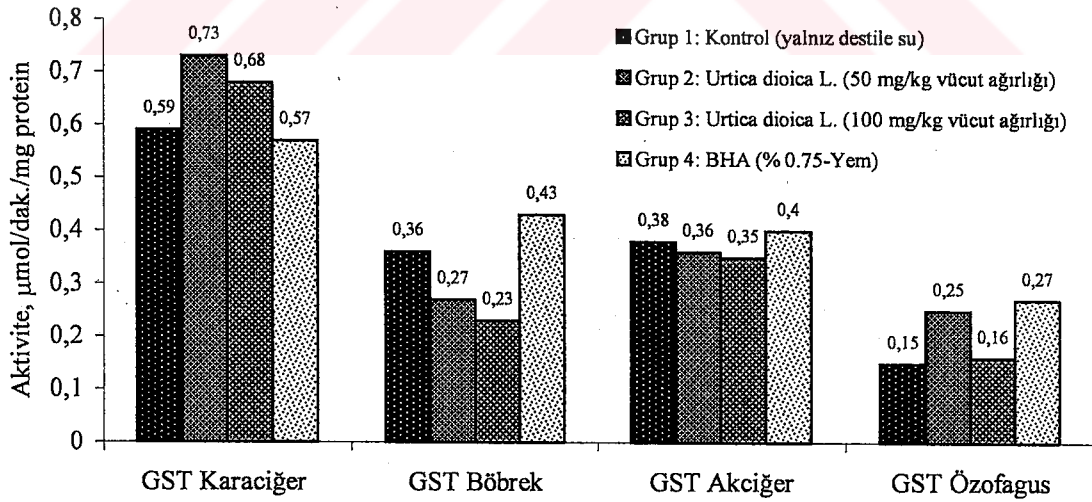
**Tablo 37.** Deneysel hayvanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolik glutatyon S-transferaz aktivitesi

Grup	Uygulama	GST Karaciğer (A)	GST Böbrek (A)	GST Akciğer (A)	GST Özofagus (A)
I	Kontrol (yalnız destile su)	0.59±0.06 (1.00)*	0.36±0.02 (1.00)*	0.38±0.01 (1.00)*	0.15±0.02 (1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L. (50 mg/kg vücut ağırlığı)	0.73±0.09 <sup>d</sup> (1.23)*	0.27±0.02 <sup>c</sup> (0.75)*	0.36±0.02 <sup>**</sup> (0.94)*	0.25±0.02 <sup>c</sup> (1.65)
III	<i>Urtica dioica</i> L. (100 mg/kg vücut ağırlığı)	0.68±0.06 <sup>b</sup> (1.16)*	0.23±0.01 <sup>c</sup> (0.65)*	0.35±0.02 <sup>b</sup> (0.91)*	0.16±0.01 <sup>**</sup> (1.05)*
IV	BHA (% 0.75 + Yem)	0.57±0.03 <sup>**</sup> (0.96)*	0.43±0.02 <sup>c</sup> (1.19)*	0.40±0.03 <sup>**</sup> (1.04)*	0.27±0.01 <sup>c</sup> (1.76)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrolle bağlı değişim oranı; \*\*anlamli olmayan değer;

A:  $\mu\text{mol/dak./mg}$  sitozolik protein



**Şekil 39.** Dört gruba ait karaciğer, böbrek, akciğer ve özofagus sitozolünde glutatyon S-transferaz aktivitesinin dağılımı

GST için yapılan DUNNET t-testinde  $p=9.15 \times 10^{-13}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için

fark vardır. I. grup ve III. grup arasında fark yoktur. I. grup ve IV. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.

### 3.2.4.3. Deneysel Hayvanların Karaciğer Mikrozomlarında Lipid Peroksidasyon ve Karaciğer Sitozolünde Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon düzeyi spektrofotometrik olarak tayin edilmiş değerleri Tablo 38 de verilmiştir. Lipid peroksidasyonu kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda 1.31 kat, yüksek dozda 1.12 kat artmasına karşın BHA grubunda % 5 azalma gözlenmiştir. (Şekil 40).

Lipid peroksidasyon için yapılan DUNNET t-testinde  $p=3.094 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar arasında kontrole göre anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=3.02 \times 10^{-5}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. grup arasında  $p=0.08317$  için fark yoktur. I. grup ve IV. grup arasında  $p=0.733$  için fark yoktur.

**Tablo 38.** Deneysel hayvanlarının karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon ve karaciğer sitozolünde laktat dehidrogenaz aktivitesi :

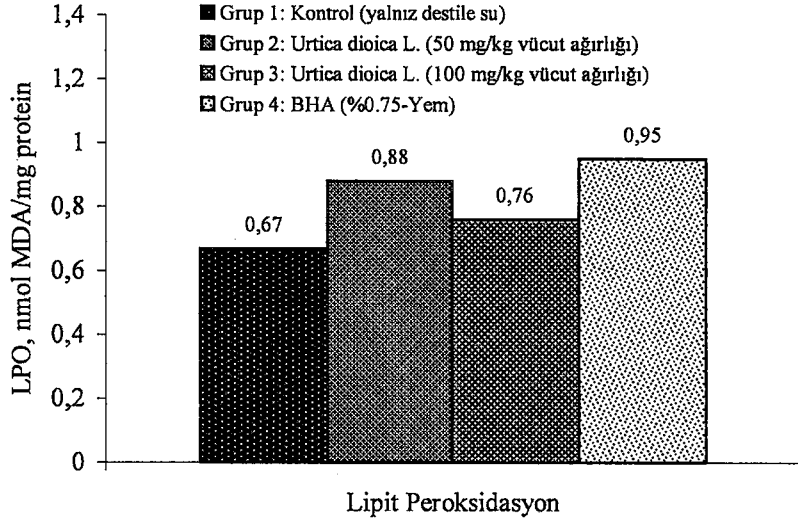
Grup	Uygulama	LPO (A)	LDH (B)
I	Kontrol	0.67±0.09	0.145±0.011
	(yalnız destile su)	(1.00)*	(1.00)*
II	<i>Urtica dioica</i> L.	0.88±0.05 <sup>c</sup>	0.096±0.008 <sup>c</sup>
	(50 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.31)*	(0.66)*
III	<i>Urtica dioica</i> L.	0.76±0.08**	0.110±0.007 <sup>c</sup>
	(100 mg/kg vücut ağırlığı)	(1.12)*	(0.75)*
IV	BHA	0.64±0.03**	0.073±0.005 <sup>c</sup>
	(% 0.75 + Yem)	(0.95)*	(0.50)*

Kontrol grubuna göre istatistiksel analiz; ( $p < 0.01$ )<sup>a</sup>; ( $p < 0.05$ )<sup>b</sup>; ( $p < 0.001$ )<sup>c</sup>; ( $p < 0.005$ )<sup>d</sup>

\*kontrole bağlı değişim oranı; \*\*anlamlı olmayan değer

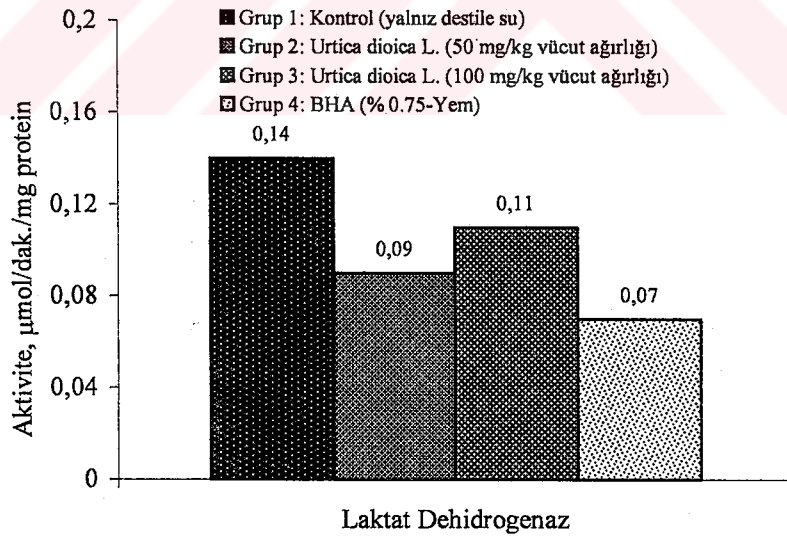
A: nmol MDA/mg mikrozomal protein

B: µmol/dak./mg sitozolik protein



Şekil 40. Dört gruba ait karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon düzeyi

I., II., III. ve IV. gruplardan alınan karaciğerlerin uygun homojenizasyonu ve santrifügasyonu işlemlerinden sonra karaciğer sitozolünde spektrofotometrik olarak tayin edilmiş olan laktat dehidrogenaz aktivitesi değerleri Tablo 38 de verilmiştir. Laktat dehidrogenaz aktivitesi kontrole göre, *Urtica dioica* L. nin uygulanan düşük dozunda % 34, yüksek dozunda % 25 ve BHA grubunda % 50 azalmıştır (Şekil 41).



Şekil 41. Dört gruba ait karaciğer sitozolünde laktat dehidrogenaz aktivitesinin dağılımı

Laktat dehidrogenaz için yapılan DUNNET t-testinde  $p=3.54 \times 10^{-14}$  ve  $\alpha=0.001$  için gruplar kontrole göre arasında anlamlı fark vardır. I. grup ve II. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve III. arasında  $p=7.97 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır. I. grup ve IV. grup arasında  $p=7.91 \times 10^{-6}$  ve  $\alpha=0.001$  için fark vardır.



#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Doğal antioksidantlar bitkilerin bütün kısımlarında bulunmaktadır. Bu antioksidantlar alkaloidler, yağ asitleri, vitaminler, flavonoidler, karotinoidler ve fenolik bileşikleri içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidantlar singlet oksijen giderici, serbest radikal süpürücü, peroksit giderici ve enzim inhibitörleri gibi fonksiyonel özellikler göstermektedir. Bitkilerde bu etkin maddeler dışında, farklı yapıda dengeleyici veya yönlendirici madde olarak tanımlanan başka maddelerde vardır. Etkin maddelerin, bir bitkinin tedavi etme gücünü ne oranda etkilediğinin saptanabilmesi, ancak bitkinin etkin özelliklerinin belirlenmesi sonucunda ortaya çıkartılabilir [72]. Bu nedenle halk arasında yaygın olarak kullanılan *Origanum vulgare* L., *Thymus leucotrichus* L., *Origanum laevigatum* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L., *Urtica dioica* L., *Urtica pilulifera* L., *Satureja hortensis* L., *Viscum album* L. ve *Hypericum venustum* Fenzl. nin antioksidant aktiviteleri tayin edildi.

Literatürde, *Origanum vulgare* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L., *Urtica dioica* L. ve *Satureja hortensis* L., nin *in vitro* antioksidant aktiviteleri ile ilgili çalışmalar bulunmasına karşın, *Viscum album* L., *Thymus leucotrichus* L., *Origanum laevigatum* L., *Hypericum venustum* Fenzl. ve *Urtica pilulifera* L. ile ilgili bulunmamaktadır. Ayrıca BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve L-askorbik asitin antioksidant aktiviteleri hem bitkilerle ve hemde birbiriyle karşılaştırılmış çalışmalar bulunmamaktadır.

*In vitro* çalışmalarda kullanılan Tiyosiyanat Metodu antioksidant aktivite tayininde yaygın kullanılan yöntemdir. En yüksek antioksidant aktivite gösteren *Urtica dioica* L. ( $p<0.05$ ) ye yakın aktiviteyi *Satureja hortensis* L. ( $p<0.05$ ), *Urtica pilulifera* L. ( $p<0.05$ ), *Thymus leucotrichus* L. ( $p<0.05$ ), *Origanum vulgare* L. ( $p<0.05$ ) ve *Viscum album* L. ( $p<0.05$ ) gösterdi. Bu bitkilerin ekstraktlarının 30. saat sonundaki inhibisyon değerleri sıra ile 80.57, 79.28, 78.32, 76.95, 75.47 ve 68.33 olarak hesaplandı. Ayrıca standart antioksidant maddelerden en yüksek antioksidant aktiviteyi gösteren BHA ( $p<0.05$ ) ya en yakın aktiviteyi  $\alpha$ -tokoferol ( $p<0.05$ ), L-askorbik asit ( $p<0.05$ ) gösterdi. Bu standart antioksidantların 30. saat sonundaki inhibisyon değerleri sıra ile 77.80, 73.33 ve 72.47 olarak hesaplandı. İnhibisyon değerleri antioksidant aktivite gösteren bu bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivite sonuçlarını desteklemektedir (Tablo 18 ve 19) (Şekil 23 ve 24). Bu çalışmamızda, Tiyosiyanat Metodu ile tayin edilen *Urtica dioica* L., *Satureja hortensis* L., *Urtica pilulifera* L. ve BHA antioksidant aktiviteleri aynı metodla tayin edilen *Camellia sinensis* L. antioksidant aktivitesi ile uyum içerisinde [54]. *Urtica dioica* L. sulu ekstraktının serbest radikalleri temizleme kapasitesi, LPO ve ksantin oksidaz inhibisyonu elde edilen *in vitro* bulguları desteklemektedir [73,74]. Çalışmamızda, *Origanum vulgare* L. nin

oksidasyon ve inhibisyon değeri yüksektir. Ayrıca bir *in vitro* alışmada *Origanum vulgare* L. nin yapraklarının etanol ekstraktının oksidasyon düzeyi elde edilen bulgularla uyum içerisinde [75]. Elde edilen sonuçlara göre, *Satureja hortensis* L. etkin antioksidant aktivite gösteren bitkilerdendir. Çalışmamızda, *Satureja hortensis* L. ekstraktının antioksidant aktivitesinin sentetik antioksidant BHT ye göre yüksek olduğu belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir [76]. Çalışmamızda, BHT, *Origanum vulgare* L. ve *Satureja hortensis* L. ekstraktının oksidasyon ve inhibisyon düzeyi *Ocimum basilicum* L., *Mentha spicata* L. den yüksek olduğu bulunmuştur. BHT nin ve bitki ekstraktlarının oksidasyon düzeyleri literatür ile uyum içerisinde [77]. Standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivitesi sıra ile BHA,  $\alpha$ -tokoferol, L-askorbik asit ve BHT seklinde azalmaktadır. *In vitro* alışmamızın sonuçları, daha önce yapılan çalışmalarla uyum içerisinde olup BHA [78], BHT [79],  $\alpha$ -tokoferol [80] ve L-askorbik asit [81] etkin oksidasyon düzeyleri hakkında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 18 ve 19) (şekil 23 ve 24).

Literatürde, alışmamızda kullanılan bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü bütün olarak karşılaştırılmamıştır. İndirgeme gücü, bitkinin ve standart antioksidant maddenin indirgeme kapasitesi potansiyel antioksidant aktivitenin önemli bir belirteci olabilir [82]. En yüksek indirgeme gücünü gösteren *Urtica dioica* L. ( $p<0.05$ ) ye yakın *Satureja hortensis* L. ( $p<0.05$ ), *Mentha spicata* L. ( $p<0.05$ ), *Origanum vulgare* L. ( $p<0.05$ ), *Urtica pilulifera* L. ( $p<0.05$ ) ve *Thymus leucotrichus* L. ( $p<0.05$ ) gösterdi. İndirgeme gücü sıra ile 0.445, 0.409, 0.349, 0.328, 0.313, ve 0.205 bulunmuştur. Ayrıca standart antioksidant maddelerden en yüksek indirgeme gücü gösteren BHA ( $p<0.05$ ) ya en yakın aktiviteyi BHT ( $p<0.05$ ) ve L-askorbik asit ( $p<0.05$ ) gösterdi. İndirgeme gücü sıra ile 0.974, 0.745 ve 0.669 bulunmuştur (Tablo 23) (şekil 25).

*Tilia Argentea Desf Ex DC*, *Salvia Triloba* L. ve *Camellia sinensis* L. sulu ekstraktlarının indirgeme gücü Oyaizu Metodu' na göre tayin edilmiştir [54]. *Salvia Triloba* L. en yüksek indirgeme gücü gösterdiği belirlenmiştir. Bu *in vitro* alışmada elde edilen bulgulara göre, *Urtica dioica* L., *Satureja hortensis* L., *Origanum vulgare* L., *Thymus leucotrichus* L., *Mentha spicata* L. ve *Urtica pilulifera* L. bitkilerinin yaprak ekstraktlarının *Tilia Argentea Desf Ex DC*, *Salvia Triloba* L. ve *Camellia sinensis* L. ye göre daha yüksek indirgeme gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.

Bazı bitkilerin ve standart antioksidant maddelerin antioksidant aktivite ve indirgeme gücü sonuçları birbirlerini desteklememektedirler. Potansiyel antioksidantların antioksidant aktivitesi, peroksitlerin detoksifikasyonu, geçiş metal iyonlarının kataliz etkisini geciktirme, zincir reaksiyonlarını engelleme ve radikalleri temizleme aktiviteleri farklı mekanizmalarda



etkilidirler. Böylece antioksidant aktivite ile indirgeme gücü doğrudan ilişkili değildir [83]. Bu sonuçlara göre, örneklerin indirgeme gücü, antioksidant aktivitenin bir göstergesi olmasına rağmen bu iki aktiviteler arasında lineer korelasyon olmayabilir.

Son yıllarda doğal biyoaktif bileşikler farklı şekillerde kanseri engellemede kimyasal koruyucu reaktif olarak kullanılmaktadır. Normal veya prenoplastik durumlarda kanserin yayılmasını durduran, geciktiren ve değiştiren doğal ürünler olan kimyasal koruyucular veya sentetik bileşikler içeren farmakolojik araştırmalar artmaktadır [84].

Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu temel organ olan karaciğer tarafından kontrol edilmektedir. Böbrek, akciğer ve özofagusda da detoksifikasyon enzim sistemleri vardır. Fakat bu enzim sistemlerinin etkisi karaciğerde daha fazladır. Kanser ve tümör gelişimine elverişli olduğundan akciğer, böbrek ve özofagus organlarında faz II ve antioksidant enzimleri içeren *in vivo* çalışmalar yapıldı.

*In vivo* çalışmada, *Urtica dioica* L. nin hidroalkolik ekstraktının iki farklı dozunun uygulanması, bazı hepatik enzim sistemlerinin ve antioksidant enzimlerin aktivitesini belirgin şekilde güçlendirdiği veya modifiye ettiği gözlemlendi (Tablo 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 ve 38) (Şekil 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 40 ve 41). *Urtica dioica* L. nin ekstraktı uygulamalarda enzimatik ve enzimatik olmayan aktivasyon mekanizmaları için önemli olan bazı biyotransformasyon ve antioksidant enzim sistemlerinin aktivitelerini düzenleyebilir.

*In vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre BHA *in vivo* çalışmalarda kullanıldı. BHA etkin antioksidant madde olduğu ve daha önce yapılan çalışmaları desteklediği belirlenmiştir [33,34,85].

BHA, deney hayvanı model sisteminde etkin antioksidant aktivite özelliği ve kimyasal koruyucu etkiyi desteklemek için pozitif kontrol olarak kullanıldı. BHA ve *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktının iki farklı dozunun deney hayvanlarında herhangi bir anormal etkisi gözlenmedi. Yeme katılarak verilen BHA ve ağız yoluyla düzenli olarak uygulanan *Urtica dioica* L. deney hayvanlarının ne vücut ağırlıklarını azaltıcı ne de tahrip edici düzeyde herhangi bir etkisi gözlenmedi (Tablo 26, 27, 28 ve 29) (Şekil 26, 27 ve 28). Deney hayvanlarının son vücut ağırlıkları ile karaciğer doku ağırlıkları oranı normal vücut metabolizmasında düzenleyici etkisi olan belirgin bir artış göstermemiştir. Hücresel düzeydeki LDH aktivite değerleri *Urtica dioica* L. ve BHA'nın hücre hasarına hiçbir etkisi olmadığını göstermektedir [86]. Herhangi bir yan etki göstermeyen *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktının iki farklı dozu (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı/14 gün) dozu önemli ölçüde toksik değildir (Tablo 38) (Şekil 41). *In vitro* çalışmamızda elde edilen bulgular *Adhatoda vesica* L. ve *Aegle marmelos* L. bitkileri ile benzer etki göstermiştir [87,88]. Ancak *Urtica dioica* L.

yaprak ekstraktının *Adhatoda vesica* L. bitkisine göre LDH daha fazla etkilediği belirlenmiştir.

Sitokrom (cyt) süper gen ailesinin bir ürünü olan mikrozomal cyt P450 sistemi endoplazmik retikulum membranında başlıca elektron taşıma zincirini oluşturur [89]. Cyt P450 sistemi içeren mikrozomlardaki detoksifikasyon reaksiyonunda elektronlar flavoprotein, cyt b<sub>5</sub> R veya cyt P450 R üzerinden NADPH veya NADH dan cyt P450 ve cyt b<sub>5</sub> nin farklı izomorfik faktörlerine akar. Cyt P450 oksidatif aktivitesinin birçok ksenobiyotik bileşiğin detoksifikasyonunda önemli rolü vardır. Faz I metabolizmasının esas fonksiyonu ilaçların kolayca emilimi ve faz II metabolizması için bileşik hazırlamada etkisi önemlidir. Faz II metabolizması sonucu ksenobiyotik ve ilaçların detoksifikasyonu suda çözülebilir ürünlerin elde edilmesinde etkilidir [90]. *In vivo* çalışmamızda, *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktı cyt b<sub>5</sub> ve cyt b<sub>5</sub> R nin ölçülen bütün komponentlerin düzeyini artırdı (Tablo 34 ve 35) (Şekil 35 ve 36). Böylece *Urtica dioica* L. nin cyt b<sub>5</sub> ve cyt b<sub>5</sub> R sistemine etkisi kanserojenlerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda etkili olabilir. Çalışmamızda elde edilen bulgular *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktının cyt b<sub>5</sub> ve cyt b<sub>5</sub> R aktivitelerini *Adhatoda vesica* L., *Aegle marmelos* L. ve *Andrographis paniculata* L. bitkilerine göre daha fazla artırdığı belirlenmiştir [87,88,91].

GST canlı organizmalarındaki endojen ligandların (GSH) konjugasyonunda önemli fonksiyonu olan detoksifikasyon enzimidir. GST farklı sitotoksik, mutagenik ve kanserojenik kimyasallara karşı korumada etkilidir [92]. DTD birçok antikanserojenik substratın etkisinin tayininde kullanılan enzimdir. DTD kinonların ve metabolitlerin (benzen, aromatik hidrokarbon, hidrokinon, v.b.) toksik etkisinden korur [93]. DTD semikinon radikalinin elimine edilmesini ve kinonun biyoaktif metabolizmasını kolaylaştırır. DTD tarafından kinonun iki elektronun indirgenme-yükseltgenme sonucu oluşan reaktif aktif ara ürünlere karşı koruma özelliği vardır [94]. Deney şartlarında, *Urtica dioica* L. nin iki farklı dozunun uygulaması sonucu karaciğerde ve özofagusta GST ve DTD aktivitelerinde önemli derecede artış olduğu gözlemlendi (Tablo 36 ve 37) (Şekil 38 ve 39). Böylece *Urtica dioica* L. endojen ligandlara karşı GST ve kinonlar gibi bazı metabolitlerin toksik etkisinden korumada DTD aktivitelerini artırmada etkili olabilir. *Adhatoda vesica* L., *Aegle marmelos* L. ve *Andrographis paniculata* L. bitkileri ile yapılan *in vivo* çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında, *Urtica dioica* L. ekstraktının GST ve DTD aktivitelerini daha fazla artırdığı görülmektedir [87,88,91].

Serbest radikaller ve aktif oksijen türleri yaşlanma, kanser ve bazı patolojik değişimlerde etkilidir [29,31]. Antioksidant özelliği olan birçok doğal ve sentetik bileşik

tedavi amacı ile, baharat ve yiyecek olarak sürekli kullanıldığında metabolik radikal türleri kısmen veya tamamen elimine edebilir [4,6]. İlaç metabolizmasında etkili organ karaciğer olmasına rağmen, bir çok enzim böbrek, akciğer, özofagus, deri ve diğer organlarda da aktivite gösterirler [40].

Vücut reaktif oksijen ürünlerinden enzimatik ve enzimatik olmayan sistemlerde korur. *Urtica dioica* L. hücreye ait enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidant savunma sistemini düzenleyerek oksidatif etkiyi önemli derecede azaltabilir. *Urtica dioica* L. nin antioksidant kapasitesinin deney hayvanlarının karaciğer ve diğer organlarında (böbrek, akciğer ve özofagus) GR, GPx, -SH, SOD ve KAT' in spesifik aktivitelerini bazal seviyede düzenlediği gözlemlendi (Tablo 30, 31, 32 ve 33) (Şekil 29, 30, 31, 32 ve 33). *Urtica dioica* L. nin antioksidant parametreleri artırarak gösterdiği antioksidatif cevap normal hücre metabolizmasını etkileyen serbest oksijen radikallerinin elimine edilmesinde katkıda bulunabilir. Antioksidant enzimler kanser önlemede olduğu kadar immün sistem bozukluğu, kardiovasküler hastalıklar ve reperfüzyon bozukluğu gibi bazı olumsuzlukları gidermede yeterli değildir [95]. Çünkü, antioksidant enzim sistemleri ilaç ve ksenobiyotiklerin olumsuz etkisinden oluşan hidroperoksitler ve organik peroksitlerin elimine ederek ve oksijen radikallerinin dismutasyonunu hızlandırarak hidrojen peroksit ve oksijenin fizyolojik seviyede kalmasında önemli rol oynamaktadır. Buna göre, *Urtica dioica* L. *in vivo* etkin antioksidant özelliğini göstermede etkili olabilir. *Urtica dioica* L. nin uygulanan yüksek dozundaki lipid peroksidasyonundaki azalma antioksidant enzimlerin düzeyini desteklemektedir. Karaciğerde laktat dehidrogenazın azalması ve *Urtica dioica* L. nin uygulanan yüksek dozdaki malondialdehit (MDA) oluşumu membran hasarına neden olan prooksidasyona karşı koruduğu kadar hücre membranını da koruyabilir (Tablo 38) (Şekil 40 ve 41). Ayrıca, glutasyon mekanizması substratla doyuma ulaştığında glutasyon peroksidaz tarafından oluşturulmasına karşın hidrojen peroksitin konsantrasyonunun düşük olmasında katalaz önemli rol oynar [96]. Bu nedenle *Urtica dioica* L. etkisi ile LPO' daki azalma antioksidant enzimlerle ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Bu *in vivo* çalışmada elde edilen bulgulara göre, *Urtica dioica* L. yaprak ekstraktının *in vivo* antioksidant parametrelerine (GR, GPx, SOD ve KAT) olan etkileri *Adhatoda vesica* L., *Aegle marmelos* L. ve *Andrographis paniculata* L. ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmaların sonuçları ile uyum içerisindedir. *Urtica dioica* L. ekstraktının özellikle hepatik SOD ve KAT aktivitelerini daha fazla etkilediği sonuçlar elde edildi. Ayrıca *Urtica dioica* L., böbrek sitozolik SOD aktivitesine daha fazla etki gösterdiği belirlendi. *Urtica dioica* L., akciğer ve

özofagus sitozolik SOD ve KAT aktivitelerini doza bağılı olarak daha etkili olduğu sonuçlar elde edildi [88,89,92].

GR seviyesindeki artış NADPH'ın tüketiminde önemli rol oynar ve hücrede GSSG-GSH döngüsünü düzenler [97]. Böylece *Urtica dioica* L. nin GR'ın katalitik aktivitesini artırmada etkili olabilir.

SOD aktivitesi sonucu DTD etkisiyle kinonun otooksidasyonundan meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe edebilir. SOD aktivitesindeki artış, katalaz tarafından uzaklaştırılan hidrojen peroksit ile süper oksit radikalinin dismutasyonunu hızlandırır [38]. *Urtica dioica* L. nin LPO azaltması, KAT ile kojugasyonu ve süperoksit oluşumu reaktif oksijen türlerinin hücre hasarına karşı etkili olabilir.

Yapılan *in vivo* çalışmada *Urtica dioica* L. nin yaprak ekstraktının deney hayvanlarına ağız yoluyla uygulanması neticesinde bazı faz I ve faz II enzimleri, LDH, LPO ve antioksidant parametrelerine etkili olduğu gözlemlendi. Bütün bu etkiler çerçevesinde *Urtica dioica* L. nin muhtemelen kanserojen detoksifikasyonu artırmada etkili olduğu söylenebilir.

*Urtica dioica* L. nin mikrozomal monooksijenaz sistemi etkileyen reaktiflerin etkisini azaltması kimyasal kanserojenleri detoksifiye ve deaktive edebilir. Ayrıca, LPO, LDH, antioksidatif parametreler, faz I ve faz II enzimlerindeki değişim detoksifikasyon reaksiyonlarını hızlandırabilir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, cyt b<sub>5</sub> sistemindeki, GST, DTD, GPx, GR, KAT ve SOD aktivitelerindeki artış oksidantların yeterli olarak detoksifiye ederek metabolitlerin aktivitesini artırmasının sonucunu desteklemektedir [98]. Böylece, antioksidant enzimler anormal olduğu kadar normal hücre metabolizması sırasında üretilen toksik serbest radikallerin detoksifikasyonunda da etkili olabilir.

Serbest oksijen radikalleri veya aktive olmuş oksijen bitkisel ve hayvansal organizmalarda tamamen veya kısmen hasara neden olan yaygın çevresel faktörlerdendir. Oksijenin aktive olmuş yapıları patojenlere karşı savunmada, ksenobiyotik kimyasalların detoksifikasyonunda, hücre duvarı bileşenlerinin polimerizasyonunda ve kompleks organik moleküllerin biyosentezinde önemlidir. Böylece bitki hücrelerinde aktif oksijeni elimine eden serbest ve kompleks sistemler mevcuttur. Karotenoidler gibi bazı bileşikler fotosistemlerdeki enerji akışını hızlandırarak aktif oksijenin oluşumunu engellerler. Askorbat ve glutatyon gibi antioksidant bileşikler aktif oksijeni doğrudan detoksifiye ederek elimine eder. Bu antioksidantların sentezini, degradasyonunu ve etkin mekanizmasını katalizleyen enzimler yaşam için önemlidir.

Sonuç olarak bitkilerin farklı bileşenleri etkin antioksidant aktiviteye sahiptirler ve kusursuz düzenleme yetenekleri vardır.

## 5. ÖNERİLER

Yeryüzünde mevcut 30-75 tür bitkinin 300.000 kayıtlıdır. Bunlardan Dünya Sağlık Teşkilatı'nın kaydettiği 21.000' nin 4.000 tanesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Kayıtlı bitkilerin % 20 si bilimsel olarak incelenmiştir. Batı Avrupa'da 400.000 Türkiye'de 6.000 çeşit bitki vardır. Tıbbi bitkilerle yapılan tedavileri dikkate alan bazı ilaç firmaları, bitkilerin ilaç olarak kullanıldığı ülkelerde araştırmalar yapmaya başlamışlardır.

Sağlık ve hastalık yaşam ile iç içedir. İnsanoğlu her zaman ve her yerde hastalığın tedavisi ile mücadelesini vermektedir. Sağlık ve hastalık insanoğlunun çevresi ile karşı karşıya olduğu en etkili parametrelerdir. Bitkiler geçmişten günümüze kadar kullanılmasına karşın yeterince araştırma konusu olmamıştır. Son yıllarda kanserden kimyasal koruyucu reaktifler olarak belli sınır çerçevesinde besin değeri olmayan doğal ürünlere artan ilgi pratikte faydalı olabilecek araştırmaları güçlendirmektedir.

Tıbbi bitkilerin içerdiği etkili maddelerin bazılarının sentetik olarak elde edilmesi, tıbbi bitkilerin daha az kullanılmasına yol açmıştır. Ancak sentetik ilaçlara nazaran, tıbbi bitkilerden elde edilen doğal kaynaklı maddelerin yeni kullanılma yerlerinin bulunması ve çok yönlü etki göstermeleri değerlerinin artmasına yardımcı olabilecektir.

Türkiye'de yetişen endemik veya endemik olmayan bitki türleri bulunmaktadır. Bitkilerin içerdiği aktif bileşikler farklı yöntem ve teknikler kullanılarak kimyasal analizleri yapılabilir ve farmakolojik özellikleri incelenebilir. Ayrıca yöresel kullanımları dikkate alınarak etkin özellikleri araştırılabilir.

Bir bitkinin içerdiği aktif bileşikler (polifenoller, terpenoidler, organik asitler, azotlu bileşikler, makro moleküller v.b.) izole edilerek canlı sistemdeki etkileri araştırılmalıdır. Ayrıca bitkilerin içerdiği spesifik bileşiklerin etkileri dikkate alınarak kanser tedavisinde olduğu gibi değişik hastalıkların tedavisinde etkileri araştırılabilir.



## 6. KAYNAKLAR

1. **Rates, S.M.K., 2001.** Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
2. **Ferguson, R.L., 2001.** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475, 89-111.
3. **Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 2000.** Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul.
4. **Evans, R.C., 1995.** Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants, *Biochemical Society Symposium*, No: 61, 103-116, London.
5. **Harborne, J.B., 1998.** *Phytochemical methods*, Third edition, Chapman & Hall, London.
6. **Krinsky, N.I., 1995.** Plant carotenoids and related molecules: important dietary antioxidants, *Biochemical Society Symposium*, No: 61, 117-126, London.
7. **Davis, P.H., 1967-1982.** *Flora of Turkey and the East Aegen Islands. II-VII*, Edinburgh University Pres, Edinburg.
8. **Baytop, T., 1984.** Türkiye’de bitkiler ile tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3255, Ecz. Fak. No: 40, İstanbul.
9. **Zheng, S.Z., Wang, X.X., Gao, L.M., Shen, X.W. and Liu, Z.L., 1997.** Studies on the flavonoid compounds of *Origanum vulgare* L.. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 36 (1): 104-106.
10. **Kulevanova, S., Stefova, M., Stefkov, G. and Stafilov, T., 2001.** Identification, isolation, and determination of flavones in *Origanum vulgare* from Macedonian flora. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (4): 589-600.
11. **Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G. and Mavragani, T.P., 1998.** Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (3): 1111-1115.
12. **Milos, M., Mastelic, J. and Jerkovic, I., 2000.** Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp *hirtum*). *Food Chemistry*, 71 (1): 79-83.
13. **Tabanca, N., Demirci, F., Ozek, T., Tumen, G. and Baser, K. H., 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum x dolichosiphon* P. H. Davis. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (3): 238-241.
14. **Keita, S.M., Vincent, C., Schmit, J. P. and Belanger, A., 2000.** Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour and Fragrance Journal*, 15 (5): 339-341.

15. Nacar, S. and Tasni, S., 2000. Chemical components of different basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown in Mediterranean regions in Turkey, Israel Journal of Plant Sciences, 48 (2): 109-112.
16. Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y. and Kokkini, S., 1998. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. Phytochemistry, 49, 8, 2273-2277.
17. Kokkini, S., Karousou, R. and Lanaras, T., 1995. Essential Oils of Spearmint (Carvone-rich) Plants from the Island of Crete (Greece). Biochemical Systematics and Ecology, 23, 4, 425-430.
18. Subramanian, S. S. and Nair, A. G. R., 1972. Flavonoids of the leaves of *Mentha spicata* L. and *Anisochilus carnosus* L. Phytochemistry, 11, 1, 452-453.
19. Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R. and Yamasaki, K., 1998. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata* L.. Phytochemistry, 48, 1, 131-136.
20. Tita, B., Facecendini, P., Bello, U., Martinoli, L. and Bello, P., 1993. *Urtica dioica* L: Pharmacological effect of ethanol extract. Pharmacological Research, 27: 21-23.
21. Chaurasia, N. and Wichtl, M., 1987. Flavonol glycosides from *Urtica dioica* L.. Planta Medica (5): 432-434.
22. Styprekowska, E. and Bieganska, J., 1980. Investigations on an increase of extraction yield of protein from *Urtica dioica* L. leaves. Herba Polonica, 26 (3): 171-176.
23. Neugebauer, W., Winterhalter, P. and Schreier, P., 1995. 3-Hydroxy-alpha-ionyl-beta-d- glucopyranosides from stinging nettle (*Urtica dioica* L.) leaves. Natural Product Letters 6 (3): 177-180.
24. Esquivel, M. M., Ribeiro, M. A. and Bernardo-Gil, M. G., 1999. Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization. Journal of Supercritical Fluids, 14, 2, 129-138.
25. Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M. and Rezaii, M.B., 2002. The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L.. Flavour and Fragrance Journal, 17 (4): 275-277.
26. Misharina, T.A., Golovnya, R.V. and Beletskii, I.V., 1999. Determination of volatile components in the essential oil of summer savory by capillary gas chromatography. J. Anal. Chem., 54 (2): 198-201.



27. **Deliorman, D., Calis, I., Ergun, F., Sonmez, B., Buharalioglu, C. K. and Kanzik, I., 2000.** Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album* ssp. *album*. Journal of Ethnopharmacology, 72, 1-2, 323-329.
28. **Fernandez, T., Macelo, L., Verala, B. G. and Ricco, R. A., 1998.** Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. Et P.) Tiegh Loranthaceae. Journal of Ethnopharmacology, 62, 25-34.
29. **Akkuş, İ., 1995.** Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri, S. Ü., Tıp Fak., Biyokimya A.B.D., Konya.
30. **Harris, E.D., 1992.** Regulation of antioxidant enzymes. Faseb Jour. 6:2675-2683.
31. **Halliwell, B., J.M.C., 1984.** Oxygen toxicity and oxygen radicals, Transition Metals and Disease Biochem. J., 219, 1-14.
32. **Dündar, Y. ve Arslan, R., 2000.** Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, Afyon.
33. **Fridovich, I., 1978.** The biology of oxygen radicals. Science, 201:875-880.
34. **Yavuz T., Aslan, D., Güner, G. ve Kutay, F.Z., 2002.** Tıbbi laboratuarlarda standardizasyon ve kalite yöntemi, Türk Biyokimya Derneği Yayınları.
35. **Chauiere, J. and Ferraari-Iliou, R., 1999.** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology, 37, 949-962.
36. **Simic, G., M., 1997.** Oxygen radicals in biology and medicine, Plenum Pres, Newyork and London.
37. **Hudson, B. J. F., 1990.** Food antioxidants, Elsevier Applied Science, London and New York.
38. **Nebert, D. W. and Gonzales, F., 1978.** P 450 Genes; structure, evolution and regulation. Ann. Rev. Biochem., 56, 945-993.
39. **Guengerich, F. P., 1992.** Cytochrome P450: advances and prospects. Faseb J., 6, 667-668.
40. **Timberll, J. A., 1982.** Principles of Biochemical Toxicology, First Edition, Taylor-Francis L.t.d, England
41. **Habig, W. H., Pasbt, M. J. and Jakoby, W. B., 1974.** Glutathion S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249, 7130-7139.
42. **Lind, C., Hochstein, P., and Ernster, L., 1982.** DT-diaforase as quinone reductase: A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 216, No. 1, 178-185.
43. **Lehninger L., A., 1975.** Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, Inc., New York.

44. Halliwell, B., 1995. How to characterize antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 73-101, London
45. Halliwell, B., 1994. Free radicals antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344, 721-724.
46. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, pp 23-30.
47. Fridowich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
48. Branien, A. L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63.
49. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicines*. 20, 933-956.
50. Anonymous. [http\\www.saglikvakfi.org.tr](http://www.saglikvakfi.org.tr)
51. Diplock, A. T., 1997. Will the good faires please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease ? *Free Radical Research*, 27, 511-532.
52. Harman , D., 1995. Role of antioxidant nutrients in aging: overview, *Age*, 18, 51-62.
53. Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S. and Hayek, M., 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 14625-14765.
54. Yıldıırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F. and Bilaloğlu, V., 2000, Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenteia* Des Ex DC), sage (*Saliva triloba* L.) and black tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2750-2765.
55. Duh, P.D. and Yen, G.C., 1997. Antioxidative activity of there herbal extracts. *Food Chemistry*, 60, 4, 639-645.
56. Hocman, G., 1988. Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHA; BHT). *Int. J. Biochem.*, 20, 639-651.
57. Inverson, F., 1999. In vivo studies on buthylated hydroxyanisole, *Food Chem. Toxicol.* 37, 993-997.
58. Singh, A. and Roa, A. R., 1995. Modulatory influence of arecaunt on antioxidant 2(3)-tert-butyl-4-hydroxy anisole-induced hepatic detoxification system and antioxidant defence mechanism in mice, *Cancer Letters*, 91, 107-114.

59. **Lowry, O., Rosebrough, A., Farr, A. and Randall, R., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
60. **Folhe, L. and Otting, F., 1984.** Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, Vol 105, 93-104.
61. **Abei, H., 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, Vol 105, 121-126.
62. **Leopold, F. and Wolfgang, A. G., 1984.** Assays of glutathione peroxide. *Methods in Enzymology*, Vol 77, 114-121.
63. **Beutler, E., 1975.** Red Cell Metabolism "Manual of Biochemical Methods", Second Edition, Grune and Stratton, Inc., New York.
64. **Sedlack, J. and Lindsay, R. H., 1968.** Estimation of total, protein-Bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205.
65. **Omura, T. and Sato, R., 1964.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239 2370-2378.
66. **Omura, T. and Sato, R., 1964.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, II. solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* , 239, 2379-2385.
67. **Masters, B. S. S., Williams, C. H. and Kamin, H., 1967.** *Methods in Enzymology*, Vol. 10, (Estabrook, R. W. and Pullman, M. E., Ed. ) Academic Press, New York.
68. **Ernster, L., Danielson, L. and Ljunggren, M., 1962.** DT-diaphase-purification from the soluble fraction of rat liver cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 171-178.
69. **Simons, P.C. and Vander Jagt, D. L., 1977.** Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, 82, 334-341.
70. **Varshney, R. and Kale, R. K., 1990,** Effects of calmodulin antagonists on radiation induced lipid peroxidation in microsomes. *Int. J. Rad. Biol.*, 58, 733-743,
71. **Bergmeyer, H. U. and Brent, E., 1971,** *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol II, Academic Press, Verlag, 5574-5579.
72. **Larson, R. A., 1988.** Antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 4, 969-978.
73. **Lindsey, K.L., Motsei, M.L. and Jager, A.K., 2002.** Screening of South African food plants for antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 67 (6): 2129-2131.
74. **Pieroni, A., Janiak, V., Durr, C.M., Ludeke, S., Trachsel, E. and Heinrich, M., 2002.** In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytotherapy Research*, 16 (5): 467-473.

75. **Bendini, A., Toschi, T.G. and Lercker, G., 2002.** Antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) leaves. Italian Journal of Food Science , 14 (1): 17-24.
76. **Bandonienr, D., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D. and Murkovic, M., 2002.** Antioxidative activity of sage (*saliva officinalis* L.) savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. European Journal of Lipid Science and Technology, 104, 286-292.
77. **Marinova, E.M. and Yanislieva, N.V., 1997.** Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. Food Chemistry, 58, 3, 245-248.
78. **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. and Saura-Calixto, F., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of Science Agriculture, 76, 270-276.
79. **Shahidi, F., 2000.** Antioxidants in food and food antioxidants. Nahrung-Food, 44 (3): 158-163.
80. **Ohkatsu, Y., Kajiyama, T. and Arai, Y., 2001.** Antioxidant activities of tocopherols. Polymer Degradation and Stability, 72, 2, 303-311.
81. **Yen, G. C., Duh, P. D. and Tsai, H. L., 2002.** Ascorbic acid antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chemistry, 79, 3, 307-313.
82. **Mier, S., Kanner, J., Akiri, B. and Hadas, S. P., 1995.** Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. Journal of Agricultural Food Chemistry, 43, 1813-1819.
83. **Steinmetz, K. A. and Potter, J. D., 1996.** Vegetables, fruit and cancer prevention. Journal of American Diet Association, 96, 1027-1039.
84. **Pezzuto, J. M., 1997.** Plant-derived anticancer agents. Biochemical Pharmacology, 53: 121-133.
85. **Iverson, F., 1995.** Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. Cancer Letters, 93: 49-54.
86. **Deters, M., Siegers, C.P. and Strubelt, O., 1998.** Influence of glycine on the damage induced in isolated perfused liver by five hepatotoxic agents. Toxicology, 128, 63-72.
87. **Singh, R. P., Padmavathi, B. and Rao, A. R., 2000.** Modulatory influence of *Adhatoda vesica* L. (*Justicia adhatoba* L.) leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice. Molecular and Cellular Biochemistry, 213, 99-109.

88. Singh, R. P., Banerjee, S. and Rao, A. R., 2000. Effect of *Aegle marmelos* L. on biotransformation enzyme systems and protection against free-radical-mediated damage in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 991-1000.
89. Guengerich, F. P., 1988. Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 48, 2946-2954.
90. Gibson, G. G. and Skett, P., 1994. Introduction to drug metabolism, Blackie Academic and Professional. London, 217-258.
91. Singh, R. P., Banerjee, S. and Rao, A. R., 2001. Modulatory influence of *Andrographis paniculata* L. on Mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidant status. *Phytotherapy Research*, 15, 382-390.
92. Ketterer, B., 1988. Protective role of glutathione and glutathione S-transferase in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 202, 343-275.
93. Smart, R. C. and Zinnoni, V. G., 1984. DT-diphorase and peroxidase influence the covalent binding of the metabolities of phenol, the major metabolite of benzene. *Molecular Pharmacology*, 26, 105-111.
94. Karczewski, J. M., Peters, J. G. and Noordhoek, I., 1999. Quinone toxicity in DT-diaphorase efficient and deficient colon carcinoma cell lines. *Biochemical Biopharmacology*, 57, 27-37.
95. Saydam, N., Kirb, A., Demir, O., Hazen, E., Saydem, Oto, O., Saydem, O. And Güner, G., 1997. Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Letters*, 119, 13-19..
96. Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M. and Kirkman, H. N., 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally effective in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocyttes. *Blood*, 73, 334-339.
97. Vanoni, M. A., Wong, K. K. and Ballou, D. P., 1991. Glutathione reductase: comparison of steady state and rapid reaction primary kinetic isotope effects exhibited by yeast, spinach and *Esherichia coli* enymes. *Biochemistry*, 29, 5790-5796.
98. Wattenberg, L.W., 1992. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Research*, 52, 2085-2091.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Arhavi’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı yerde tamamladı. 1988 yılında K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü kazandı. 1992 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladı. 1995 yılında O.M.Ü., Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve Yüksek Lisans programını tamamladı. 1997 yılında O.M.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora programına başladı. 2000 yılında 803. dönem bedelli askerlik görevini yaptı.

Evli ve bir çocuk babasıdır.

