

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLKÖĞRETİM ANABİLİM DALI

**ETİL ALKOL İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESLİ SIÇANLARDA
KEÇİBOYNUZU ÇEKİRDEĞİ'NİN (*Ceratonia siliqua L.*)
KARACİĞER KORUYUCU VE ANTIOKSİDAN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Mehmet Ali TEMİZ
DANIŞMAN 1: Yrd. Doç. Dr. Atilla TEMUR
DANIŞMAN 2: Prof. Dr. İsmail ÇELİK

VAN-2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Atilla TEMUR danışmanlığında Mehmet Ali TEMİZ tarafından hazırlanan 'Etil Alkol ile Oluşturulan Oksidatif Stresli Sıçanlarda Keçiboynuzu Çekirdeği'nin (*Ceratonia siliqua L.*) Karaciğer Koruyucu ve Antioksidan Etkisi' isimli bu çalışma 27/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından İlköğretim Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Ahmet SELÇUK İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Atilla TEMUR İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil ÖZKOL İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / /2011 tarih ve 2011/ sayılı kararı ile onaylanmıştır.

imza

Enstitü Müdürü

ÖZET

ETİL ALKOL İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESLİ SIÇANLARDA KEÇİBOYNUZU ÇEKİRDEĞİ'NİN (*Ceratonia siliqua L.*) KARACİĞER KORUYUCU VE ANTIOKSİDAN ETKİSİ

TEMİZ, Mehmet Ali

Yüksek Lisans Tezi, İlköğretim Anabilim Dalı

1. Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Atilla TEMUR

2. Tez Danışmanı: Prof Dr. İsmail ÇELİK

Temmuz 2011, Sayfa 81

Bu çalışmada, etil alkol ile oluşturulan oksidatif stresli sıçanlarda keçiboynuzu çekirdeği'nin (*Ceratonia siliqua L.*) karaciğer koruyucu ve antioksidan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yirmi dört *Wistar albino* sıçan altışar gruplar halinde dört gruba ayrıldı (kontrol, %20 alkol, %15 çekirdek ve %15 çekirdek+%20 alkol). 50 günlük muamele sonunda, keçiboynuzu çekirdeği katkılı yemin karaciğer koruyucu ve antioksidan rolü için; karaciğer harabiyeti serum enzimlerinden aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), albumin (ALB) ve total protein (TP) enzim seviyeleri, beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularında antioksidan savunma unsurlarından süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri ile redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ve malondialdehit (MDA) içerikleri spektrofotometrik yöntemle tespit edilerek değerlendirilmiştir.

Bulgularda, alkol grubunun serum AST, ALT, LDH enzim seviyeleri artmış, çekirdek+alkol grubunda ALT ve LDH seviyeleri azalmıştır. Kalp dokusu haricindeki dokuların MDA değerleri alkol grubunda artmış, çekirdek+alkol grubunda düşmüştür. Antioksidan enzim sistemlerinde gruplardaki iyileşmenin nedeni çekirdeğin karaciğer koruyucu etkisi ve antioksidan rolü olabilir.

Anahtar kelimeler: Keçiboynuzu çekirdeği, antioksidan enzimler, lipid peroksidasyonu, serbest radikaller.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT AND LIVER PROTECTIVE EFFECTS OF CAROB SEED (*Ceratonia siliqua L.*) ON THE RATS INDUCED OXIDATIVE STRESS BY ETHYL ALCOHOL

TEMİZ, Mehmet Ali

The Degree of Master, Department of Elementary Education

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Atilla TEMUR

Co-Supervisor: Prof Dr. İsmail ÇELİK

July 2011, pages 81

The purpose of this study was to determine the effects of carob seed concerning with hepatoprotective effect and antioxidant role against ethyl alcohol induced oxidative stress in rats. 24 *Wistar albino* rats were divided into four groups (control, 20% alcohol, 15% seed and 15% seed + 20% alcohol). At the end of the 50-day experiment, the hepatoprotective effect and antioxidant role of carob seed supplementation feed were assessed by measuring level of serum liver damage enzymes, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), albumin (ALB) and total protein levels, antioxidant defense systems (ADS), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) activities, reduced glutathione (GSH) levels and malondialdehyde (MDA) contents in the brain, kidney, spleen, erythrocytes, heart and liver tissues of rats.

According to the findings of the study, while the levels of AST, ALT and LDH increased in alcohol group, ALT and LDH were decreased in seed + alcohol group. Also, while the value of MDA content increased in the all tissues except for the heart tissue in the alcohol group, they decreased in the tissues of the seed + alcohol group. Moreover, decreases and increases occur in the system of antioxidant enzyme defense because of the liver hepatoprotective effect and antioxidant role in carob seed + alcohol group in comparison to those of alcohol.

Key words: Carob seed, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, free radicals.

ÖN SÖZ

Son yıllarda sağlıklı beslenme ve bu olguya bağlı olarak fonksiyonel gıdalarda bulunan ve özellikle antioksidan özellik gösteren bileşikler hakkındaki araştırma ve uygulamalar gittikçe güncellik kazanmaktadır.

19. yüzyılda mühendisler metallerin oksidasyonunu yani paslanmasını ve kimyasal aşınmalarını engelleyebilecek özel bir madde keşfettiler ve bu maddeyi antioksidan olarak adlandırdılar. Günümüzde kozmetik ürünlerinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan antioksidanlar aynı zamanda yakıtlara, kauçuğa ve petrole, bozunumlarını önlemek için dengeleyici olarak ekleniyorlar.

20. yüzyılın ortalarında, gıdaların ömrünü uzatmak için çalışan bilim insanları, antioksidanları besinlere eklediklerinde doymamış yağların parçalanması sonucu ortaya çıkan kötü koku ve tadın yani bozulmanın olmadığını gördüler. Bu gelişmeler olurken devam eden araştırmaların sonucunda, insanların günlük besinlerle aldıkları vitaminlerin bazılarının antioksidan olarak sınıflandırılabilceği anlaşıldı. Ve görüldü ki insanlar neredeyse 1000 yıldır tükettikleri bazı besinlerle antioksidan alıyorlar.

Vücuda doğal besinlerden alınan antioksidanların dışında, son yıllarda antioksidan ihtiva eden çok diyet takviye ürünü ve krem çıkmıştır. Her ne kadar şu ana kadar ciddi yan etkiler, olumsuz sonuçlar veya toksisiteler görülmemiş olsa da uzun dönemde bu tür diyet takviye ürünleri ve kremlerin nasıl sonuçlar veya yan etkiler doğurabileceği kesin değildir. Şu da unutulmamalıdır ki, antioksidanlar kanser ve yaşlılık etkilerinin risklerini azaltmakta önemli de olsalar, "sihirli iksir" değildirler.

Ancak antioksidanlar, diğer stabilizatörler gibi düşük kaliteli gıda maddesinin kalitesini arttırmaz ve gıdalara herhangi bir yabancı tat ve koku vermez. Bu maddeler, iyi kalitede ham madde, uygun bir imalat tekniği, elverişli ambalajlama ve depolama yöntemleri ile birlikte kullanıldığında ürünün kalitesini korur.

Bu çalışmada, ülkemizin önemli ürünlerinden keçiyoynuzu çekirdeğinin insan sağlığı için önemi olan karaciğer koruyucu ve antioksidan rolünün in vivo olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Atilla TEMUR'a, çalışmalarımın yönlendirilmesinde bilgileriyle yardımını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. İsmail ÇELİK'e, çalışmalarım boyunca yardım eden Uzman Dr. Necati ÖZOK'a, Arş. Gör. Aldulhad

DOĞAN'a, İsmail IŞIK'a, Yakup YAYLACI'ya ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen eŐime ve aileme, çalıŐmamın değişik aŐamalarında bana yardımcı olan herkese teŐekkür ederim.

Mehmet Ali TEMİZ

Temmuz, 2011

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| ÖN SÖZ | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Serbest Radikaller | 1 |
| 1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları | 1 |
| 1.2.1. Ekzojen Kaynaklar | 2 |
| 1.2.2. Endojen Kaynaklar | 3 |
| 1.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri | 4 |
| 1.3.1. Süperoksit ve Peroksil Radikali | 6 |
| 1.3.2. Hidrojen Peroksit | 7 |
| 1.3.3. Hidroksil Radikali | 7 |
| 1.3.4. Singlet Oksijen | 8 |
| 1.4. Serbest Radikal Reaksiyonları | 8 |
| 1.5. Serbest Radikallerin Etkileri | 9 |
| 1.5.1. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri | 9 |
| 1.5.2. Proteinler Üzerine Etkileri | 11 |
| 1.5.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri | 11 |
| 1.5.4. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri | 12 |
| 1.6. Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar | 13 |
| 1.7. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları | 13 |
| 1.7.1. Enzimatik antioksidanlar | 13 |
| 1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) | 13 |
| 1.7.1.2. Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6) | 14 |
| 1.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9) | 15 |

| | |
|--|----|
| 1.7.1.4. Glutasyon-S-transferazlar (GST) (EC 2.5.1.18) | 16 |
| 1.7.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR) | 16 |
| 1.7.2. Nonenzimatik Antioksidanlar | 17 |
| 1.8. Keçiboynuzu | 18 |
| 1.9. Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri | 19 |
| 1.10. Keçiboynuzu Çekirdeklerinin Özellikleri | 21 |
| 1.11. Fenolik Bileşikler | 23 |
| 1.12. Tanenler | 24 |
| 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ | 25 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller | 27 |
| 3.1.1. Deney Hayvanı Materyali | 27 |
| 3.1.2. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler | 27 |
| 3.1.3. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler | 27 |
| 3.2. Yemlerin Hazırlanması ve Deney Muamelesi | 28 |
| 3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması | 29 |
| 3.4. Eritrosit Paketinin Hazırlanması | 29 |
| 3.5. Doku Ekstraksiyon İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi | 30 |
| 3.6. Analizlerin Yapılması | 30 |
| 3.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Tayini | 30 |
| 3.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Tayini | 32 |
| 3.6.3. Glutasyon-S-transferaz (GST) Enzim Tayini | 33 |
| 3.6.4. Lipid Peroksidasyon (MDA) Tayini | 34 |
| 3.6.5. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini | 35 |
| 3.6.6. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Tayini | 36 |
| 3.7. İstatistik Analizler | 36 |
| 4. BULGULAR | 37 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 54 |
| KAYNAKLAR | 66 |
| ÖZGEÇMİŞ | 81 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 1.1 Normal metabolizmada oksidan üretimi | 6 |
| Şekil 1.2 Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi | 11 |
| Şekil 4.1 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçi boynuzu çekirdeğinin AST seviyelerinin karşılaştırılması | 37 |
| Şekil 4.2 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçi boynuzu çekirdeğinin ALT seviyelerinin karşılaştırılması | 37 |
| Şekil 4.3 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçi boynuzu çekirdeğinin LDH seviyelerinin karşılaştırılması | 38 |
| Şekil 4.4 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçi boynuzu çekirdeğinin ALB seviyelerinin karşılaştırılması | 39 |
| Şekil 4.5 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçi boynuzu çekirdeğinin TP seviyelerinin karşılaştırılması | 39 |
| Şekil 4.6 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki MDA düzeylerinin karşılaştırılması | 40 |
| Şekil 4.7 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeylerinin karşılaştırılması | 43 |
| Şekil 4.8 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GR düzeylerinin karşılaştırılması | 45 |
| Şekil 4.9 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GPx düzeylerinin karşılaştırılması | 47 |
| Şekil 4.10 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GST düzeylerinin karşılaştırılması | 49 |
| Şekil 4.11 Etil alkol ve keçi boynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki SOD düzeylerinin karşılaştırılması | 51 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 1.1 Reaktif oksijen türleri kaynakları | 2 |
| Çizelge 1.2 Serbest radikal metabolitlerinin tespit ve tanımlaması için metotlar | 5 |
| Çizelge 1.3 Keçiboynuzu pekmezinin bazı kimyasal özellikleri | 19 |
| Çizelge 1.4 Keçiboynuzu meyvesinin bileşimi | 19 |
| Çizelge 1.5 Keçiboynuzu meyvesinin polifenol içeriği | 19 |
| Çizelge 1.6. Keçiboynuzu zamburğunun kullanım alanları ve oranı | 20 |
| Çizelge 1.7 Keçiboynuzu çekirdeklerinin bileşimi | 21 |
| Çizelge 1.8 Keçiboynuzu çekirdeğinin polifenol içeriği | 21 |
| Çizelge 4.1 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği muamelesine tabi tutulan sıçanların karaciğer harabiyet biyobelirteçleri olan serum enzim düzeyleri | 36 |
| Çizelge 4.2 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki MDA düzeyleri | 40 |
| Çizelge 4.3 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeyleri | 42 |
| Çizelge 4.4 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GR düzeyleri | 44 |
| Çizelge 4.5 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GPx düzeyleri | 46 |
| Çizelge 4.6 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GST düzeyler | 48 |
| Çizelge 4.7 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki SOD düzeyleri | 50 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|--------------------|------------------|
| μ | Mikron |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| $^{\circ}\text{C}$ | Santigrat derece |
| dk | Dakika |
| g | Gram |
| L | Litre |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| M | Molar |
| M^{-1} | 1/Molarite |
| mM^{-1} | 1/Milimolarite |
| mM | Milimolarite |
| mmol | Milimol |
| μmol | Mikromol |
| rpm | Devir/dakika |
| sn | Saniye |
| U | Ünite |

Kısaltmalar

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| ΔA | Absorbans değişimi |
| ADP | Adenozin di fosfat |
| ALT | Alanin amino transferaz |
| AST | Aspartat amino transferaz |
| ATP | Adenozin tri fosfat |
| BHT | Bütillenmiş hidroksi toluen |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| DTNB | 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) |
| e- | Elektron |

| | |
|-------------------------------|--|
| EDTA | Etilendiamin tetra asetik asit |
| GR | Glutasyon redüktaz |
| GSH | Redükte glutasyon |
| GSH-Px | Glutasyon peroksidaz |
| GSSG | Okside glutasyon |
| GSSG-R | Glutasyon redüktaz |
| GST | Glutasyon S-transferaz |
| Hb | Hemoglobin |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| KAT | Katalaz |
| LDH | Laktat dehidrogenaz |
| LOOH | Lipid hidroperoksit |
| LPO | Lipid peroksidasyonu |
| MDA | Malondialdehit |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotid |
| NAD ⁺ | Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid |
| NADH | İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid |
| NO [•] | Nitrik oksit radikali |
| ONOO [•] | Peroksinitrit |
| O ₂ ^{•-} | Süperoksit radikali |
| ¹ O ₂ | Singlet oksijen |
| OH [•] | Hidroksil radikali |
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROO [•] | Peroksil radikali |
| RO [•] | Alkoksil radikali |
| SD | Standart sapma |
| -SH | Sülfidril |
| SOD | Süperoksit dismutaz |
| TBA | Tribarbütik asit |
| TCA | Trikloraasetik asit |
| UV | Ultraviyole ışınlar |

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamak için enerjiye, enerji için ise besin tüketimine gereksinim duyarlar. Enerji üretimi ve hücrelerin normal metabolizmasının sürdürülmesi esnasında meydana gelen birçok fizyolojik tepkimede serbest oksijen radikalleri üretilebilmektedirler (Valko ve ark., 2007). Üretilen bu zararlı radikallerin süpürülmesi ise çeşitli mekanizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (Ames ve ark., 1993; Halliwell, 1994).

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda birçok yönleri ile dikkatleri üzerinde yoğunlaştırmıştır. Bir serbest radikal 1, 3, 5 gibi tek sayıda elektronlara sahip herhangi bir molekül olarak tanımlanır. Hem organik ve hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik taşırlar (Kavas, 1989).

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir (Sohol, 1993; Southam, 1993).

1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Memeli hücrelerinde reaktif oksijen türleri üreten sayısız kaynak bilinmektedir; bunlar arasında: i) mitokondriler (başlıca kompleks I & III olmak üzere aynı zamanda monoamino oksidaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz, gliserol fosfat dehidrogenaz, p66^{shc} (Starkov, 2008)), ii) endoplazmik retikulum (başlıca sitokrom P-450 ve b5 enzimleri, diamin oksidaz, Ero1 (Gross ve ark., 2006)), iii) peroksizomlar (başlıca yağ asit oksidasyonları, D-amino asit oksidaz, L-2-hidroksiasit oksidaz ve urat oksidaz (Boveris ve ark., 1972), iv) sitozol (NO sentaz, lipoksigenazlar ve PGH sentaz (Kukreja ve ark., 1986; Roy ve ark., 1994)), v) plazma membranı (NADPH oksidaz, lipoksigenaz (O'Donnell ve Azzi, 1996)) vi) hücre dışı boşluk (ksantin oksidaz (McNally ve ark., 2003)).

Çizelge 1.1'de de tanımlandığı gibi hücreler farklı serbest radikal kaynaklarına maruz kalmaktadır. Bunları endojen ve ekzojen serbest radikal kaynakları olmak üzere iki sınıfa ayırabiliriz. Endojen ve ekzojen kaynaklar hem birbirlerinden bağımsız hem de birbirleriyle ilişkili reaktif radikal kaynaklarıdır.

Çizelge 1.1 Reaktif oksijen türleri kaynakları (Beyer, 1992'den değiştirilerek alınmıştır)

| Endojen Kaynaklar | Ekzojen Kaynaklar |
|---|---------------------------------------|
| Patojen temizleyiciler (örn. nötrofil) | Gamma ışını |
| Doğrudan reaktif oksijen türleri (ROT) üreten enzimler (örn. Nitrik oksit sentaz) | UV ışını (örn. güneş ışığı) |
| Dolaylı ROT üreten enzimler (örn. Ksantin oksidaz) | Ultrasound |
| Aerobik metabolizma ve enerji üretimi (örn. Mitokondri ETZ) | Toksinler |
| Hastalıklar (iskemik işlemler) | Yiyecekler |
| | Çevre kirliliği (örn. sigara) |
| | İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol) |
| | Ksenobiyotikler |

1.2.1 Ekzojen kaynaklar

Ekzojen kaynakların çoğu endüstriyel çevre kirlenmesi ve atmosferik ışınlarla maruz kalma ile üretilmektedir. UV-C ışınlarının zararlı etkilerinden dünyada yaşayan canlıların korunmasında Ozon (O₃)'un rolü sürekli olarak vurgulanmaktadır (Thornhill, 1993). Ozonun yiyeceklerde etkili bir dezenfektan olarak kullanımı son zamanlarda ozona olan ilgiyi arttırmaktadır (Kim ve ark., 2003). Bunun yanı sıra ozon, güçlü bir okside edici ajan görevi yaparak hücre hasarı yaratabilir (Wang ve ark., 2004).

İyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan ışınlar diğer bir ekzojen reaktif oksijen türleri kaynaklarıdır. Uzun süre radyasyona maruz kalan hücrelerde iyonlaştırıcı olsun ya da olmasın her ikisi de serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (Riley, 1994; Lyng ve ark., 2001; Tulard ve ark., 2003). Kanser terapilerin de ışın kullanımı çok önemlidir. Glioma hücrelerinin radyasyona maruz kalması reaktif oksijen türlerinin üretilmesi boyunca antioksidan enzimlerin indüklenmesiyle sonuçlanır. Böylece hücreler yavaş bölünme ve büyüme gerçekleştirirler (Dal-Pizzol ve ark., 2003). Ayrıca UV-C (< 290

nm), UV-B (290–320 nm) (Jain ve ark., 2004) ve UV-A (320–400 nm) (Jurkiewicz ve Buettner, 1994) maruziyeti dolaylı olarak çeşitli reaktif oksijen türlerinin ($^1\text{O}_2$, H_2O_2 ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalleri) üretimine neden olur.

Çeşitli hava kirlilikleri örneğin sigara dumanı, endüstriyel baca gazları, egzoz gazları... gibi etmenler ekzojen reaktif oksijen türlerinin kaynaklarıdır. Bu etmenlere maruz kalınması sonucu doğrudan etkileşim ile deri hücreleri, solunum ile akciğer hücreleri etkilenmekte ve zarar görmektedir (Menzel, 1994; Ghio ve ark., 2001; Kelly, 2003; Kelly ve Sandstrom, 2004). Farklı ksenobiyotik kaynakları örneğin toksinler, pestisitler ve diğer endüstriyel amaçlı kimyasallar *in vivo* olarak metabolize olduklarında reaktif oksijen türleri üretmektedirler (Abdollahi ve ark., 2004). Yiyecekler de önemli oksidan kaynaklarından birisidir. Özellikle kızarmış yiyecekler, yüksek derecede ve farklı türlerde oksidan içeren peroksitler, aldehitler, okside olmuş yağ asitleri ve geçiş metalleri tarafından oksitlenirler (Addis, 1986; Ames, 1986; Goburdhun ve Jhurree, 1995; Halliwell ve ark., 1995). Demir ve bakır gibi geçiş metalleriyle okside olmuş yiyeceklerin tüketilmesi bağırsak mukozasında hasara neden olabilir (Schumann, 2001).

1.2.2 Endojen kaynaklar

Hücre içinde farklı endojen reaktif oksijen türleri kaynakları vardır. Şu ana kadar hücre içinde en önemli reaktif oksijen kaynağı mitokondriyal elektron transfer zinciridir (ETZ). Toplam metabolik oksijenin yaklaşık %98'i mitokondride sitokrom oksidaz tarafından kullanılmaktadır. Mitokondri elektron kaçaklarına karşı iyi izole edilmesine rağmen, en az iki yerde elektronlar sızabilir ve moleküler oksijenle reaksiyona girebilir. Bu yerler Kompleks I ve Ubisemikuinon'dur (McCord, 2000). Elektronlar mitokondri membranının içine sızdığına herhangi bir makromolekül ile reaksiyona girer. Bu elektronların en iyi hedeflerinden bir tanesi süperoksit anyonu oluşturmak için moleküler oksijendir (Nohl ve ark., 2003).

Süperoksit, arjinin ya da tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentaz ile sonuçlanacak şekilde diğer enzimatik kaynaklardan üretilebilir (Fang ve ark., 2002b). Örneğin, aktif nötrofillerde NADPH oksidazı O_2 'yi okside etmek için NADPH'ı

kullanması (Babior, 2000); ürik asit üretiminde ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz tarafından ksantin ve hipoksantin oksidasyonunda (Radi ve ark., 1992); monoaminlerin oksidasyonundan (geçiş metallerinin iz miktarda varlığında dopamin, epinefrin, norepinefrin ve hemoglobinin) (Fang ve ark., 2002a); sitokrom P-450 tarafından O_2 'nin bir elektron indirgenmesinden sonra (Sakai ve ark., 1992; Fleming ve Buse, 2001).

Diğer radikal olmayan reaktif oksijen türleri normal metabolizmadan da oluşurlar. Örneğin süperoksit dismutaz, $O_2^{\cdot-}$ molekülünü H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür. Hidrojen peroksit üreten diğer metabolik yollar uzun ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizlerler. Hidrojen peroksit üreten diğer metabolik yolları ise şöyle ifade edebiliriz: O_2 'nin iki elektron indirgendiği sitokrom P-450 (Bondy ve ark., 1994; Goeptar ve ark., 1992), D-amino asit oksidaz (Fang ve ark., 2002a), peroksizomal proteinler (ürik asiti allantoina dönüştüren ürik asit oksidaz (insanlarda fonksiyonel olmayan bir enzim)) ve asetil koenzim A oksidazdır.

Hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturur. Peroksinitrit, $O_2^{\cdot-}$ ya da H_2O_2 'den bile daha reaktiftir. Ayrıca peroksinitrit kan damarları, deri, kalp, akciğer, böbrek ve beyinde oksidatif ve nitratif hasarı arttırmaktadır (Beckman ve ark., 1996). Aktif nötrofillerde radikal türlerini radikal olmayan formlara dönüştürmek için kullanırlar. Örneğin $HOCl^-$ (çamaşır suyu, ağartıcı) (patojen saldırılarına karşı kullanılır) miyeloperoksidaz tarafından H_2O_2 ve Cl^- 'nin katalizlenmesinden oluşturulur (Babior, 2000).

Özet olarak, reaktif oksijen türleri endojen ve ekzojen kaynaklardan üretilirler ve kontrolsüz düzen altında makromoleküllerin hasarına neden olurlar. Ancak aerobik organizmalar bu hasarları engellemek için çiftli oluşumlar ya da pasifleştirici mekanizmalar geliştirmişlerdir. Örneğin ürik asit oksidaz vasıtasıyla oluşturulan hidrojen peroksit (H_2O_2) diğer enzimler tarafından (katalaz veya peroksidaz) H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür.

1.3. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal hücre fonksiyonları esnasında üretilirler. Hidroksil radikalleri (OH^{\cdot}), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik

oksit (NO[•]) reaktif oksijen türleri arasındadır. Bu türlerin yüksek kimyasal reaktivitelerinden dolayı çok karasız bir yapıları vardır. Bu yüzden lipid peroksidasyonuna, bazı enzimlerin oksidasyonuna, yoğun bir protein oksidasyonuna ve indirgenmesine öncülük ederler (Matés ve ark., 1999). Oksijenden türetilmiş türlerin hücre hasarları ve ölümlerindeki rolleri gün geçtikçe daha iyi tanımlanmaktadır: dejeneratif değişikliklerin pek çoğunda süperoksit ve hidroksil radikalleri rol oynar, peroksidatif süreçteki artışla birleştirilmiştir ve ayrıca düşük antioksidan konsantrasyonlarıyla da bağlantılıdır (Tamagno ve ark., 1998).

Çizelge 1.2 Serbest radikal metabolitlerinin tespit ve tanımlaması için metotlar (Rice-Evans ve Burdon, 1994)

| Metot | Avantaj | Dezavantaj |
|--|---------------------------|--|
| 1. Ürün analizi | Analitik teknikler | Belirsiz bulguları desteklemez |
| 2. Serbest radikal söndürücüler (antioksidanlar) | Basit teknik | Radikal yapıları hakkında az bilgi verir |
| 3. Süperoksit dismutaz (SOD) | Basit, yüksek spesifite | Sadece SOD'a uygulanabilir |
| 4. Elektron Spin (paramagnetik) Resonans | | |
| a. Doğrudan | Ürünlerin yapısal bilgisi | Yeterli uzun yaşamı olmayabilir |
| b. Dolaylı (Spin ayırıcı) | Geniş uygulama alanı | Yapısal bilgi tamamlanmamış olabilir |

Serbest radikallerin yüksek reaktivitelerinden dolayı onların tespit edilmesini güçleştirir. Çizelge 1.2'de özetlendiği üzere biyolojik sistemler üzerinde serbest radikallerin tanımlanması için kullanılan yaygın metotlar avantaj ve dezavantajlarıyla birlikte verilmiştir. Genellikle tespit çalışmaları dolaylı olarak (örneğin SOD) analizler yoluyla yapılmaktadır. Ancak doğrudan bir serbest radikalde çiftlenmemiş elektron bulunmasını tespit eden Elektron Spin (paramagnetik) Resonans (ESR ya da EPR) bir spektroskopik tekniktir (Rice-Evans ve Burdon, 1994).

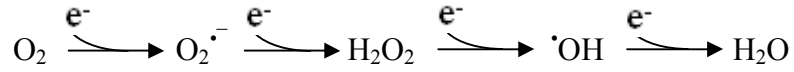
Düşük seviyelerdeki reaktif oksijen türleri pek çok biyokimyasal süreçte kaçınılmazdır. Bu süreçler arasında; hücrede farklılaşmaya, hücre içi mesajlaşmaya, hücrenin gelişmesi ya da büyümesinin durdurulmasını, hücre ölümünü, bağışıklığı ve mikroorganizmalara karşı savunmayı sayabiliriz. Aksine yüksek dozlarda ve yetersiz bir

şekilde reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmaması oksidatif stres ile sonuçlanır ki bu da ciddi metabolik bozukluklara ve biyolojik makromolekül hasarlarına neden olabilir (Matés ve ark., 1999).

1.3.1. Süperoksit ve Peroksil Radikali

Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerin tanıdıkları en reaktif toksik maddeler olup, oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenidirler. Solunumla alınan oksijenin % 5 kadarı organizmada serbest radikallere dönüşür (Kılınç, 1995).

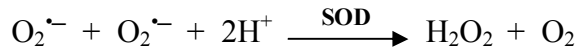
Bu serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içerirler (Southam, 1988). Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron alması ile de peroksil radikali (ROO^{\cdot}) oluşur (Fridovich, 1975). Süperoksidin düşük seviyeleri sürekli olarak oksijenli solunum tarafından üretilir. Mitokondride elektron transport zincirinde bazen tek bir elektron kaçağı olur. Bu kaçak su oluşturmak için moleküler oksijene dört elektron eşlik etmesi esnasında olur.



Şekil 1.1 Normal metabolizmada oksidan üretimi.

$O_2^{\cdot-}$ 'nin, H_2O_2 'nin ve $\cdot OH$ 'in oluşumu O_2 'ye peş peşe elektron eklenmesi sonucu oluşur. Sitokrom oksidaz mitokondride enerji üretimi esnasında dört elektronu ekler ancak bu orta dereceli toksiklerin üretimi kaçınılmazdır.

Vücutta depo edilmiş demirin dolaşım sistemine salınmasıyla süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirger. Böylelikle süperoksit, hidrojen peroksit ile reaksiyona girer ve hidroksil radikali üretilir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür (Matés, 2000).



Reaktif oksijen türlerinin organizmaya verdiği önemli hasarlardan biri de lipit peroksidasyonuna neden olmasıdır. Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinden (ÇDYA) bir elektronun ayrılması ile sonuçlanır. Karbon merkezli radikal yeni bir düzenlemeye girerek O_2 varlığında peroksil radikallerini (ROO^{\cdot}) oluşturur. Bu

serbest radikal reaksiyonun yayılması peroksil radikallerinin diğer çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) ile reaksiyona girmeleri ve yağ asidi hidroperoksiti (ROOH) ve diğer karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olur (Martha, 2000).

1.3.2. Hidrojen Peroksit

Oksijenli solunum yapan canlılarda oksijenin suya indirgenmesi esnasında oluşan reaktif oksijen türleri sağlıklı durumlarda belirli oranlarda canlılığın devamı için gereklidir (Akkuş, 1995; Bast, 1991). Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), süperoksitin bir elektron alması sonucu ise peroksit oluşur. Peroksit molekülü de 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. Ancak, biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluştuğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir (Halliwell, 1984; McCord, 1993). H_2O_2 , biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte, $\cdot OH$ radikali gibi daha reaktif oksidanların oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır.

Elektron transport zinciri elemanlarından kompleks III çalışmaları, süperoksidin direk mitokondrinin dışına salınımını göstermektedir. Ancak hidrojen peroksit üretiminin ölçümleri, bu salınımın mitokondride Cu-Zn SOD eksikliğinde bile toplam elektron kaçağının sadece %50'inden daha az olarak hesaplandığını gözler önüne sermiştir. Geriye kalan elektron kaçağının %50'sinin ise matriksten salınan süperoksitten kaynaklandığı öne sürülmektedir (Valko ve ark., 2007).

1.3.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali; geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksitin (H_2O_2) indirgenmesiyle meydana gelen çok reaktif bir radikaldir. Bu reaksiyon ilk kez Fenton

tarafından tanımlandığı için “Fenton reaksiyonu” olarak isimlendirilmektedir. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda da açığa çıkar. Bu reaksiyona ise “Haber-Weiss Reaksiyonu” adı verilmektedir (Henle, 1997; Matés, 1999). Ayrıca NADPH-sitokrom P-450 redüktaz sisteminin varlığında okratoksin-demir bileşiği, son derece etkin ve zehirli hidroksil grubunun oluşmasına yol açar (Mercan, 2004).

1.3.4. Tekli (Singlet) Oksijen

Tekli (singlet) oksijen (1O_2) hücreler için toksik olabilen enerji yüklü çok reaktiftir, ama yüksüz bir reaktif oksijen türevidir (Singleton ve ark., 2006). Singlet oksijen, çok reaktif, kısa ömürlü ve çeşitli biyolojik molekülleri kolayca okside edebilir (Kanofsky, 1989). Singlet oksijen, (i) ultrasonikasyon esnasında, (ii) enerjinin ışıkla uyarılmış floresan boyasından oksijene transferi esnasında, (iii) süperoksitin hidrojen peroksit ile reaksiyonunda hidroksil radikali oluşumu esnasında veya (iv) hipohalit ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon esnasında üretilir (Singleton ve ark., 2006). Singlet oksijenin, karotenoidler tarafından baskılanma (Singleton ve ark., 2006), fenolik bileşikler tarafından oluşumunun engellenmesi veya azaltılması (Rice-Evans ve ark., 1995), β -karotenler tarafından oksijene dönüştürme (Diplock, 1991), A vitamini sayesinde enerjisinin alınması ve C vitamini sayesinde ise etkili bir şekilde temizlenmesi sağlanmaktadır (Kılınç, 1985).

1.4. Serbest Radikal Reaksiyonları

Serbest radikal reaksiyonlarını tek bir başlık altında toplamak ya da sınıflandırmak oldukça güçtür. Özet bir şekilde, içerisinde serbest radikal içeren herhangi bir reaksiyon serbest radikal reaksiyonudur.

Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam eder. Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450),

peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir (Akkuş, 1995).

Biyolojik hasara neden olan serbest radikallerin zararlı etkileri oksidatif ve nitrojen stres olarak adlandırılır (Kovacic ve Jacintho, 2001). Biyolojik sistemlerdeki bu hasarların sebepleri bir taraftan aşırı reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi diğer taraftan da bu üretimleri engelleyecek ya da azaltacak olan enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların eksikliğidir. Kısaca metabolik oksijen kullanımı ve oksidan-antioksidan dengenin bozulması sonucu canlı organizmalarda biyolojik hasarlar oluşabilmektedir. Aşırı üretilen reaktif oksijen türleri membran lipidleri, protein ve DNA gibi yapıların normal çalışma düzenlerini engelleyerek hasara neden olabilirler. (Dröge, 2002).

1.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücre komponenti olan her fragmente saldırarak hasara neden olmaktadır. Bunlardan en çok bilinen ve üzerinde inceleme yapılanları: Proteinler, lipidler, aminoasitler, enzimler ve DNA'dır (Diplock 1991; Akkuş 1995; Bianchi ve ark., 1999). Daha öncede belirtildiği üzere pek çok serbest radikal kısa ömürlüdür, bu nedenle diğer makromoleküller ile hemen reaksiyona girerler. Reaktif oksijen türlerinin en reaktif olanı hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali üretilir üretilmez hemen hasara yol açar. Reaksiyon oran sabiti 10^7 - 10^9 $m^{-1}s^{-1}$ kadar yüksek biyolojik komponentlerin olduğu varsayıldığında biyolojik sistemlerde hidroksil radikalinin saniyenin on milyarda birlik (10^{-10}) bir ömrü vardır. Hidroksil radikalının yüksek reaksiyon oranından dolayı DNA, protein, lipid, aminoasit, şeker ve metalleri içeren makromolekülleri okside edebilir. Hidroksil radikalleri üç ana kimyasal reaksiyona katılırlar: hidrojen çalma, ekleme ve elektron transferi (Halliwell and Gutteridge, 1999)

1.5.1. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri

Serbest radikaller kısa ömürlüdürler ve bu nedenle makromoleküller ile hemen reaksiyona girerler (Halliwell and Gutteridge, 1999). Makromoleküller arasında serbest

radikallere karşı en hasas olanları lipidlerdir. Membrandaki kolestrol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (Akkuş, 1995).

Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan ÇDYA'nin (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında), serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Freeman ve Crapo, 1982; Aleynik ve ark., 1997).

Biyolojik sistemlerde bu serbest radikallerin süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) olduğu, bununla birlikte lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikal hidroksil radikali (OH^{\cdot}) olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaştırılması yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olur (Southorn, 1988; Krahenbuhl ve ark., 1995). Bu şekilde hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidinin lipid radikali halini almasıyla yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi sonucu konjuge dienler oluşur. Ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipid peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedirler (Freeman ve Crapo, 1982). Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollabe olur. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehitler oluşur (Nair ve ark., 1986; Rice-Evans ve ark., 1991; Akkuş, 1995). Devam eden tepkimeler sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan malondialdehite (MDA) dönüşürler (Valko ve ark., 2007; Karihtala ve Soini, 2007). Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda SOR'un arttığını gösterir (Von Sonntag, 2006). MDA olduğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Hücre içine girince birçok yapı için zararlı etki gösterir (Gilbert ve Colton, 1999).

1.5.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden (ÇDYA) daha az hassastırlar ve başlayan serbest radikal reaksiyonlarının ilerleme olasılığı daha azdır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenmeleri içeriklerindeki aminoasit çeşitlerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin doymamış sülfür bağı içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Reaksiyon sonucu ise özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir ve immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Akkuş, 1995).

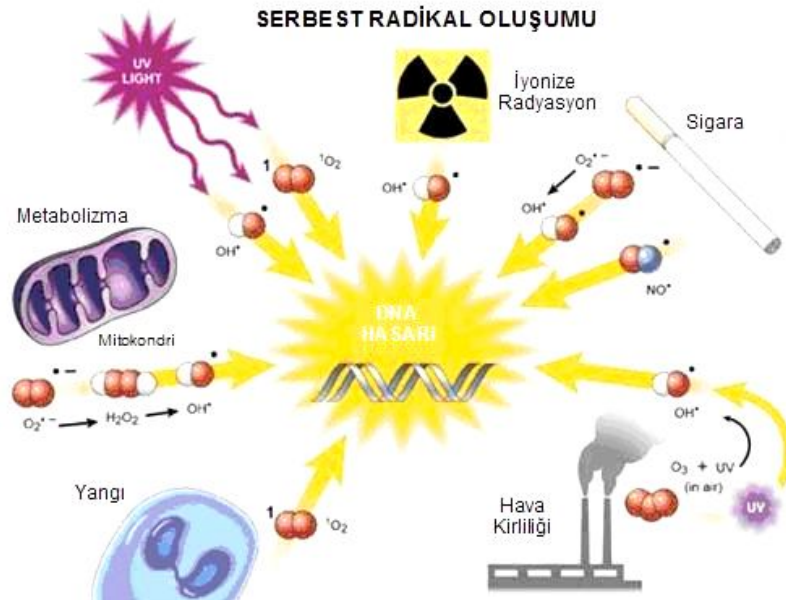
Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (Kayalı ve Çakatay, 2004).

1.5.3. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir (Akkuş, 1995; Maxwell, 1995). Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Karbonhidrat ve çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) oksidasyonunun bir ürünü olan glyoxal'in hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (Akkuş, 1995).

1.5.4. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller çeşitli mekanizmalarla DNA'da ki deoksiriboz şekere ve bazlara saldırarak DNA hasarına neden olurlar (Gutteridge ve ark., 1981; Demple, 1990; Tachon, 1995). Çift sarmal DNA'da heliksin dış kısımlarında yer alan deoksiriboz şeker oksidasyona karşı çok duyarlıdır (Birnboim ve Kanabus-Kaminska, 1985; Demple, 1990). Bazı çalışmalar göstermiştir ki, H_2O_2 varlığında bakır iyonları demir iyonlarına göre daha büyük bir etkiyle DNA'nın baz hasarlarını indüklemektedir (Dizdaroğlu ve ark., 1991). Oksidatif reaksiyonlar sonucunda DNA zincirinde çapraz bağlanma meydana gelir ve bunun sonucunda genetik bilginin transkripsiyonu değişir. Yüksek konsantrasyonlardaki oksijen serbest radikalleri DNA zincirinin kırılmasına neden olurlar. DNA oksidasyonu mutasyona ve kanserojenik etkiye neden olur (Wei ve Frenkel 1991). Mutasyon, hasarlı DNA zincirinin replikasyonu sırasında meydana gelir. DNA polimeraz bir lezyonla karşılaştığında veya enzim zincirdeki modifiye genetik bilgiyi yanlış okuduğunda replikasyon bloke edilir. Replikasyon bloke edilmezse hatalı yeni zincir oluşur (Murata-Kamiya ve ark., 1997).



Şekil 1.2 Serbest radikal oluşumları ve DNA'ya etkisi.

1.6. Serbest Radikallere Bağlı Hastalıklar

Günümüzde serbest radikallerin etkili olduğu pek çok hastalık bildirilmiştir. Bunların en önemlisi kanserdir. Birçok doku ve organ kanserinde serbest radikallerin etkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanısıra, alzheimer, parkinson, huntingtons hastalıkları ve multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların; romatoid artrit, glomerulonefrit gibi immün sistem hastalıklarının; ateroskleroz, iskemi gibi dolaşım sistemi hastalıklarının; gastrointestinal sistem, yangı ve hastalıklarının, down sendromu ve diyabet gibi genetik ve metabolik hastalıkların; nefrit ve hepatit gibi organ hastalıklarının; katarakt, glokom gibi oftalmik problemlerin; pnömoni, astım, hipoksi gibi akciğer hastalıklarının serbest radikallerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Ono ve ark., 1991; Aruoma, 1998; Matés, 1999).

1.7. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları

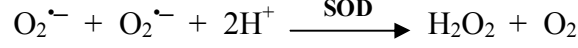
Antioksidanlar; H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini düşük tutup, $^{\cdot}OH$ radikallerini azaltma yönünde fonksiyon gösterirler. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenirler (Şahin ve Gümüşlü 2004).

1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1)

İlk kez 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmış olan süperoksit dismutaz enzimi (SOD) (Riemarsma ve ark., 1991); oksijenli solunum reaksiyonları esnasında oluşan süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizler (Flohe ve Ötting, 1984; McCord, 1985; Sun ve ark., 1988; Sankarapandi ve Zweier, 1999). Katalizlediği bu reaksiyon spontan olarak meydana gelir ve SOD aracılığı ile reaksiyon hızı 4000 kat artar (Flohe ve Ötting, 1984). Hücresel reaksiyonlarda süperoksit düzeylerini kontrol etmede,

doğrudan oksidatif hasara karşı hücreleri korumada önemli role sahip bir enzimdir (Flohe ve Ötting, 1984; McCord, 1985; Sun ve ark., 1988; Sankarapandi ve Zweier, 1999).



Süperoksit radikallerinin dismutasyonunu katalizleyen bu enzim ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Bu enzimin ksantin-ksantin oksidaz deney sistemine eklendiğinde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (Mc Cord ve Fridovich, 1969).

Reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunmanın ilk basamağını SOD oluşturur. SOD aktivitesiyle açığa çıkan hidrojen peroksiti suya indirgeyen glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) ikinci savunmayı oluşturular. Bu nedenle SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, ikinci kademe savunma enzimlerinin aktivitesinde bir artışa neden olmaktadır. Yüksek süperoksit üretimine karşı bir adaptasyonu gösteren SOD artışı ile GSH-Px arasındaki dengesizlik, hücrelerdeki oksidatif stresin bir göstergesidir. Bir başka ifadeyle SOD/GSH-Px oranındaki yükselme oksidatif hasara ve patolojik olayların başlamasına neden olabilir (Gaeta, 2002). SOD enziminin canlılar için önemi, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını engelleyerek antioksidan savunma sağlamaktır (Niwa ve ark., 1990).

1.7.1.2. Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6)

Katalaz enzimi glikoprotein yapısında bir hemoproteindir (Von Sonntag, 2006). Katalaz dört subüniteden oluşur. Her subünite bir hem grubu içerir ve katalazın aktivitesini gerçekleştirmekle sorumludur (Al-Abrash ve ark., 2000; Mari ve Cederbaum, 2001). Katalaz eritrosit sitoplazmasında bulunmakla birlikte tüm hücrelerin peroksizomlarında mevcuttur. Özellikle karaciğer ve eritrositte en yüksek konsantrasyonda; böbrekte oldukça yüksek; beyin, kalp ve iskelet kasında düşük; destek dokusunda en düşük konsantrasyonda aktiviteye sahiptir (Pryor, 1986). Hidrojen peroksiti, su ve oksijene dönüştürür.



H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkili temizleme sağlar (Halliwell, 1974). Katalaz saniyede 40 milyon molekül aktivitesiyle çok etkilidir ki, H_2O_2 'nin makromoleküllerle reaksiyona girmesinden önce hidrojen peroksit detoksifikasyonunda ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmıştır. (Al-Abrash ve ark., 2000; Mari ve Cederbaum, 2001). Katalaz enzim aktivitesi, ortamda H_2O_2 konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda açık bir şekilde artmaktadır. Ancak ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan glutatyon peroksidaz (GPx) gibi diğer antioksidan enzimler devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (Dat ve ark., 2000). KAT ve GPx enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık gösterirler. GPx enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken (Gilbert ve Colton, 1999), CAT enzimi peroksizomlarda bulunmaktadır (Karihtala ve Soini, 2007).

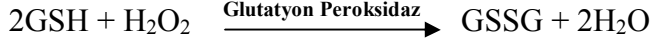
1.7.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz bünyesindeki dört selenyum atomuyla selenoprotein ailesine ait olup peroksidazlara karşı önemli rol oynayan bir savunma mekanizmasıdır (Imai ve Nakagawa, 2003).

Glutatyon peroksidazın memelilerde bu güne kadar tanımlanmış dört farklı türü vardır; i) klasik hücresel enzim (cGPx), ii) fosfolipid hidroperoksiti metabolize eden enzim (phGPx), iii) gastrointestinal bölge enzimi (gGPx), iv) hücre dışı plazma enzimi (pGPx) (Brigelius-Fhole, 1999).

GPx, H_2O_2 ve diğer hidroperoksidleri indirgerken glutatyonun redükte formunu (GSH) kullanır. Redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR) aracılığıyla okside glutatyondan (GSSG) elde edilir (Akkuş, 1995). GPx enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunur (Gilbert ve Colton, 1999) ve düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında etkili bir şekilde H_2O_2 'yi ortamdan uzaklaştırır (Dat ve ark., 2000). Bu şekilde lipid

peroksidasyonunu önleyerek biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir rol üstlenir (Freeman ve Crapo, 1982; Brigelius-Fhole, 1999; Young ve Woodside, 2001).



1.7.1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18)

GST'lar glutasyon'nun (GSH) konjugasyonundan sorumlu fonksiyonel enzimler olarak bilinirler. Bu enzim elektrofilik substratlarla glutasyon'nun konjugasyonunu katalizleyen detoksifiye edici izoenzimlerdir (Hayes ve Strange, 1995). GST'lar glutasyon içerisinde bazı grupların yer değiştirmesi, yeni grupların eklenmesi ve çıkarılması gibi birçok olayı yürütmektedir (Hollingworth ve Dong, 2008).

GST, ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücrel savunmada yer alan, taşıdığı bir elektrofilik merkez ve indirgenmiş GSH ile konjugasyon yoluyla daha çözünebilir ve daha kolay ayrıştırılabilir bileşiklere dönüştüren, intraselüler bir protein ailesidir (Mantle ve ark., 1990; Mannervik ve ark., 1992; Hayes ve Pulford, 1995).

1.7.1.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

GSH'nun yüksek konsantrasyonları ve GSSG'un düşük düzeyleri canlıların yaşamları için gereklidir. GSH, oksidazlar tarafından protein sülfidlerine tercih edilen bir substrat olup protein sülfidril oksidasyonunu önler. GSH, protein sülfidlerinin oksidasyonunu geriye de çevirir. Yüksek GSH ve düşük GSSG düzeyleri önemlidir, çünkü yüksek GSSG düzeyleri protein sülfidleriyle reaksiyona girer ve proteinleri inaktive eden karışık glutasyon-protein sülfidleri oluşturur. Gerekli GSH-GSSG oranları glutasyon redüktaz (GR) ve glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimleri tarafından devam ettirilir. NADPH'nin G6PD üretimi de oksijen hasarının tamirinde gerekli biyosentetik süreçlerde önemli olabilir (Erenel ve ark., 1993).

1.7.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlardan endojen olanlar: Glutasyon, sistein, melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin, ekzojen antioksidan olanlardan vitaminler: α -tokoferol (vitamin E), β -karoten-retinol (vitamin A), askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat), minarellerden ise selenyum, bakır, çinko, polifenoller, flavonoidleri sayabiliriz (Misso ve ark., 2005).

Redükte glutasyon (GSH), glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid antioksidandır. GSH-peroksidaz reaksiyonu için zorunlu bir co-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu nedenle $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ ve 1O_2 ile reaksiyona girerek, onları nötralize eder (Levine ve Kidd, 1986). Proteinlerdeki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso ve Clarkson, 2003).

Vitamin E, tokoferol yapısında olup dört tipi mevcuttur ve α -tokoferol en fazla bulunan şeklidir. Dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır (Akkuş, 1995). Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki koruma mekanizmasıdır. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (Miquel ve ark., 2006).

Vitamin C, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidandır (Sinclair ve ark., 1990). Askorbik asit suda eriyen peroksil radikallerini ve/veya lipid peroksidasyonu ürünlerini etkisiz hale getirmede birincil etkiye sahip bir antioksidandır (Martha, 2000; Cowie, 2002). Aynı zamanda α -tokoferol ve askorbik asit sinerjik özellik göstermektedirler (Martha, 2000). Çünkü E vitamini radikaller ile reaksiyona girdiğinde kendisi radikal form olan tokoferoksil radikaline dönüşmektedir. C vitamini ise membranlara bağlanmış tokoferoksil radikalini aktif α -tokoferole çevirerek E vitaminin dayanıklılığını artırmaktadır (Martha, 2000; Cowie, 2002). Bu nedenle oksidasyon sonucu C vitamini tükenmedikçe E vitaminin tükenmesi söz konusu değildir (Martha, 2000).

Vitamin A, peroksil radikalleri ile onlar lipid peroksidasyonunu başlatıp hidroperoksitleri üretimini yaymadan önce birleşir ve böylece zincir kırıcı antioksidan olarak işlev görür. Retinol etkili bir peroksil radikali süpürücüsüdür (Vince, 1999). β -

karoten ise antioksidan özelliğe sahip olup süperoksit radikalının kuvvetli bir süpürücüsüdür. Özellikle singlet oksijeni tutarak oksidasyon stresine karşı hücreyi korumaktadır (Umemura ve Yokota, 1997; Esselty, 2000).

Melatonin, yüksek lipofilik özelliği olup membranları kolaylıkla geçer. Özellikle $\cdot\text{OH}$ radikalini ortadan kaldırmada çok etkili bir antioksidandır (Yazıcı ve Köse, 2004). Sistein, serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır (Akkuş, 1995). Seruloplazmin, SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Demirin +2 değerlikli halden +3 değerlikli hale yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını engeller. Ürik asit, normal plazma konsantrasyonlarında $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ ve $\text{ROO}\cdot$ radikallerini temizler. Albümin geçiş metallerini bağlar, lipidhidroperoksid ve hipoklorid toplayıcısıdır (Misso ve ark., 2005). Transferin, dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir. Bilirubin, serbest radikal tutucusudur, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ radikali toplayıcısıdır (Aycicek ve ark., 2005). Glukoz, $\cdot\text{OH}$ radikal tutucusudur (Nakano ve ark., 1999). Piruvat güçlü bir antioksidandır ve H_2O_2 bağlayıcı özelliği vardır (Zhou, 2001).

1.8. Keçiboynuzu

Keçiboynuzu, harnup olarak da adlandırılan yeryüzünün en eski bitkilerinden birisidir. İlk olarak M.Ö. 4000 yıllarında Mısır’ da ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Tunalıoğlu ve Özkaya, 2003). İngilizcesi “carob”, genelde “St. John’s Bread” olarak bilinir. Anlamı “Yakup Peygamberin Ekmeği” olup, Yakup peygamberin çölde ekmek yerine tükettiği rivayet edilen bir meyvedir (Anonim, 2011). Baklagiller familyasına ait olup binominal adı *Ceratonia siliqua L.*’dir.

Her daim yeşil olup, Akdeniz ülkelerinde doğal yayılım göstermektedir (Calixto ve Cañellas, 1982). Ancak doğal yayılım haricinde de Akdeniz ülkeleri dışında ABD, Avustralya, Güney ve Kuzey Afrika’da da geniş olarak keçiboynuzu yetiştiriciliği yapılmaktadır (Coppen, 1995). Bu meyve türü ülkemizde, İzmir Urla’dan başlayarak, Hatay’ın Samandağ ilçesine kadar olan 1750 km’lik kıyı şeridinde yayılım göstermektedir. Bu kıyı şeridinde ise keçiboynuzuna en yoğun olarak kıyıda 1-2 km’lik

mesafede rastlanmakla birlikte, deniz seviyesinden 600-700 m yüksekliğe kadar iç bölgelerde de bu meyve türüne rastlanabilmektedir (Seçmen, 1974).

Keçiboynuzu ağacının temel iki ögesi vardır. Bunlar meyve ve tohum kısımlarıdır. Meyveleri ham iken yeşil, olgunlaşınca kahverengi, ortalama 25 cm uzunluğunda olmaktadır. Çekirdekleri ise meyve ağırlığının yaklaşık % 10'luk kısmını oluşturmaktadır.

Keçiboynuzu bitkisine asıl önem kazandıran meyvenin içerisinde bulunan çekirdekleridir. Keçiboynuzu çekirdekleri bir dizi işleme tabi tutularak gıda sanayinde çok önemli bir katkı maddesi olan keçiboynuzu zambına dönüştürülmektedir. Keçiboynuzu çekirdeğinin zamb özelliği ise çekirdeğin kabuk ve embriyosu arasında kalan endosperm tabakasının öğütülmesiyle ortaya çıkmaktadır. Keçiboynuzu çekirdeklerinin endospermilerinden elde edilen bu zambsız madde, başta dondurmalar olmak üzere yoğurt, puding, eritme ve krem peynirleri, su bazlı jöleler, şekerlemeler, balık ürünleri, içecekler, ketçap, mayonez, salça, unlu mamüller ve dondurulmuş gıdalar gibi birçok ürünün en önemli bileşeni olmaktadır (Coppen, 1995; Battle ve Tous, 1997). Keçiboynuzu zambı, gıda endüstrisi dışında kağıt, boya, tekstil ve plastik sanayinde, petrol ve petrokimya, mobilyacılık, kibrit, deterjan bazı eczacılık ve kozmetik uygulamalarında da kullanılmaktadır (Coppen, 1995; Marakis, 1996; Avallone, 1997; Barracosa ve ark., 2007). Dünya yıllık keçiboynuzu üretimini Makris ve Kefalas (2004) yaklaşık 310000 ton, Ayaz ve ark. (2009) son verilere göre yaklaşık 400000 ton olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemiz ise bu paya 13500 ton keçiboynuzu üretimi ile katkı sağlamaktadır (Biner ve ark., 2007).

1.9. Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri

Keçiboynuzu meyvesinin yaklaşık %90'ını etli kısım meydana getirir. Bu kısımda sukroz, glukoz, selüloz ve tanen yönünden oldukça zengindir (Rizzo ve ark., 2004). Bu içeriklerinden dolayı özellikle ülkemizde kışın hem hastalıklardan koruyucu hem de enerji verici olarak pekmez şeklinde, doğrudan ya da çeşitli gıdalara karıştırılarak değişik şekillerde tüketilmektedir. Ülkemizde pek de yaygın olmasa da Morton (1987)' e göre çekirdeklerinden arındırılmış ve öğütülmüş keçiboynuzu zengin

şeker içerinden istifade edilerek kakao gibi sıcak ya da soğuk süt ile karıştırılıp tüketilebilmektedir. Ancak bazı kaynaklar yüksek kondanse tanen içeriğinden dolayı tüketiminin kontrollü yapılmasını önermektedir (Morton, 1987; Bravo ve ark., 1994; Avallone ve ark., 1997; Batlle ve Tous 1997). Yousif ve Alghzawi (2000)' e göre ise, düşük tanen içeriği rapor edilmiştir.

Keçiboynuzunun içeriğindeki gallik asitten dolayı ağrı kesici, alerjiye karşı, astıma karşı, bronşite karşı, antioksidan, antibakteriyel, karaciğeri toksinden arındırıcı, bağışıklık sistemini güçlendirici, antiviral ve antiseptik özellikte olduğu tahmin edilmektedir (Anonim, 2011a). Toplam mineral madde miktarı % 2.23-2.42 arasında olup, mineral maddelerin dağılımında en önemli payı 3501-6059 mg/kg arasında değişen miktarı ile potasyum (K) almaktadır (Karkacier ve Artık, 1995).

Turhan ve ark. (2007)'nin keçiboynuzu pekmezi ile yaptıkları bir çalışmada ise mineral maddelerin dağılımı şöyledir:

Çizelge 1.3 Keçiboynuzu pekmezinin bazı kimyasal özellikleri

| Mineraller | (mg/100g) |
|----------------|-----------|
| Potasyum (K) | 10573.8 |
| Fosfor (P) | 777.85 |
| Magnezyum (Mg) | 555.45 |
| Kalsiyum (Ca) | 3149.87 |
| Sodyum (Na) | 171.30 |
| Demir (Fe) | 14.19 |
| Bakır (Cu) | 5.30 |
| Çinko (Zn) | 4.26 |
| Manganez (Mn) | 3.29 |

Avallone ve ark. (1997)'nin yaptıkları bir çalışmada, rapor ettikleri bazı meyve içeriği ve toplam polifenol, proantoksiyanidin ve elligitinin içeriği şöyledir:

Çizelge 1.4 Keçibounuzu meyvesinin bileşimi

| Örnek | Nem % | Kül % k.a. | Protein % k.a. | Yağ % k.a. | Sukroz % k.a. | D- glukoz % k.a. | D- fruktoz % k.a. | Nişasta % k.a. |
|-------|----------|---------------|-------------------|---------------|------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Meyve | 6 | 2 | 2 | 0.4 | 35 | 5 | 7 | 0.5 |

% k.a. yüzde kuru ağırlık

Çizelge 1.5 Keçiboynuzu meyvesinin polifenol içeriği

| Örnek | toplam polifenol ^a | proantoksiyanidin ^b | elligitanin ^c | gallotanin ^d |
|-------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Meyve | 16 | 2.46 | 0.34 | 0.490 |

^a mg gallik asit/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^b mg (/)kateşin/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^c mg 4,6-hekzahidroksidifenoil-glukoz/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^d mg gallik asit/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

1.10. Keçiboynuzu Çekirdeğinin Özellikleri

Keçiboynuzu çekirdeği temelde 3 bölümden oluşmaktadır. Bunlar dıştan içe doğru çekirdek kabuğu, endosperm ve embriyodur. Çekirdek kabuğu oldukça sert ve kabuğun hemen altında iki yarım halinde beyaz ve yarı saydam yapıda endosperm bulunur. Çekirdeğin en iç kısmında endosperm yarımalarının tam ortasında ise sarı renkli öz (germ, embriyo) yer almaktadır. Ağırlığın % 30-33'ünü kabuk, % 20-25'ini embriyo ve % 40-50'sini endosperm meydana getirmektedir (Coppen, 1995).

Çekirdekler meyve ağırlığının yaklaşık %10'unu kapsamakta ve çekirdek endosperminin başlıca içeriğini galaktoman (polisakkarit) oluşturmaktadır (Calixto ve Cañellas, 1982; Morton, 1987; Battle ve Tous, 1997). Çekirdek endosperminin öğütülmesiyle elde edilen keçiboynuzu zıncığı (E410) pek çok alanda kullanılmaktadır.

Çizelge 1.6. Keçiboynuzu zammının kullanım alanları ve oranı (Anonim, 2011b)

| Kullanım Alanları | Sağladığı Özellikler | Kullanım Oranı (g) |
|---------------------------------|---|---------------------------|
| Dondurma | Erimeyi geciktirir, kaymaksı bir tat verir, hacimsel büyüme sağlar, ısı şokuna direnci artırır | % 0.1-0.3 |
| Yoğurt & Puding | Su bırakmayı önler, daha düzgün bir yapı oluşturur | % 0.1-0.3 |
| Eritme ve Krem Peynir | Düzgün ve mükemmel bir yapı oluşturur | % 0.2-0.35 |
| Su bazlı jöleler ve Konserve et | Carrageenan, Xanthan ve Agar-Agar ile birlikte kullanıldığında jel gücünde artış sağlar, su salmayı önler | % 0.2-0.5 |
| Şekerleme | Su salmayı önler, sürülebilirliği artırır | % 0.2-0.4 |
| Balık ürünleri | Kırılmayı önler, paketlemeyi kolaylaştırır | % 0.2-0.4 |
| İçecekler | Yapıyı geliştirir, tortu oluşumunu azaltır | % 0.1-0.4 |
| Ketçap, mayonez, salça ve sos | Yağlı ve yağsız yapının stabilitesini sağlar | % 0.3-1.0 |
| Unlu mamüller | Kırılganlığı azaltır, yapıyı geliştirir | % 0.3-0.6 |
| Donmuş gıdalar | Buzların çözülmelerine karşı kararlılık göstermesini sağlar | % 0.1-0.5 |
| Diyet gıdalar | Glutenin yerini tutar ve düşük kalorili katkı olarak görev yapar | % 0.3-1.0 |

Avallone ve ark., (1997) yaptıkları bir çalışmada keçiboynuzu çekirdeğinin içeriğini çizelge 1.6'da ve çizelge 1.7'deki gibi bildirmişlerdir.

Çizelge 1.7 Keçiboynuzu çekirdeklerinin bileşimi

| Örnek | Nem % | Kül % k.a. | Protein % k.a. | Yağ % k.a. | Sukroz % k.a. | D- glukoz % k.a. | D- fruktoz % k.a. | Nişasta % k.a. |
|----------|----------|---------------|-------------------|---------------|------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Öz | 4 | 6 | 1 | 2.8 | 4.5 | 0.2 | 0.3 | 0 |
| Çekirdek | 9 | 1 | 1 | 1.1 | 0.4 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

% k.a. yüzde kuru ağırlık

Çizelge 1.8 Keçiboynuzu çekirdeğinin polifenol içeriği

| Örnek | toplam polifenol ^a | proantoksiyanidin ^b | elligitanin ^c | gallotanin ^d |
|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Öz | 40.8 | 16.2 | 1.06 | 1.92 |
| Çekirdek | 0.661 | 0.19 | 0.04 | - |

^a mg gallik asit/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^b mg (/)kateşin/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^c mg 4,6-hekzahidroksidifenoil-glukoz/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

^d mg gallik asit/g öğütülmüş örnek (kuru ağırlık).

1.11. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, antioksidan ve antiradikal özellikleri son derece yüksek olan bileşiklerdir (Lu ve Foo, 2001; Murty ve ark., 2002), radikal sonlandırıcı ve metal şelatör gibi fonksiyon görebilen ve otooksidasyonun önlenmesinde çok etkili olan sekonder metabolitlerdir (Feredioon ve ark., 1992). Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddeler ise polifenoller olarak bilinirler.

Polifenoller, invitro ortamda tokoferol ve askorbatdan daha etkili antioksidanlar olarak gösterilmektedirler. Fenolik bileşikler, lipid radikallere, hızla H⁺ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksil (ROO^{*}) ve alkoksil (RO^{*}) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Bu yönden fenolik bileşikler mükemmel H⁺ ve e⁻ donörleridir (Feredioon ve ark., 1992). Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleride bu yapılarından ileri gelmektedir. Yapılan araştırmalarda fenoliklerin bitki hücrelerinde H₂O₂'yi etkisiz hale getirmekte etkili olduğu gösterilmiştir (Takahama ve Oniki, 1997).

Polifenoller aynı zamanda serbest radikallerin rol aldığı ateroskleroz, yaşlanma, inflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etki gösterirler (Halliwell, 1994).

Fenolik bileşiklerin insan sağlığı üzerindeki bu etkilerinin yanında, fungal, viral ve bakteriyel kökenli hastalık etmenlerine karşı bitkileri koruyucu etkileri de bulunmaktadır (Goetz ve ark., 1999).

1.12. Tanenler

Fenolik bileşikler sınıfına dahil olan tanenlerin molekül ağırlıkları 500-20.000 dalton aralığındadır. Bazı yüksek molekül ağırlığına sahip olan yapılar hariç suda çözünürler, proteinlere bağlanabilirler ve çözünmeyen ya da çözünebilir tanen-protein kompleksi oluştururlar. Azotsuz, polifenolik yapıda ve amorf bileşikler olan tanenler, bitkilerin kabuk, odun, meyve, meyve tohumu, yaprak, kök gibi çeşitli dokularında ve bitki özünde bulunabilirler ve bu dokuların gelişiminin düzenlenmesinde rol oynarlar (Aydın ve Üstün, 2007).

Tanenler, proteinlerle, nişastayla ve sindirim enzimleriyle kompleks oluşturarak gıdaların besin değerinde azalmaya neden olurlar (Chung ve ark., 1998). Ayrıca, polifenol oksidaz enziminin neden olduğu esmerleşme reaksiyonları nedeniyle gıda teknolojisi açısından da arzu edilmezler. Vitamin ve minerallerin yararlılığını olumsuz yönde etkilemektedirler. Tanen varlığında A ve B12 vitaminlerinin, ayrıca iki değerli demir iyonuyla kompleks oluşturarak da demirin emilimlerini azaltmaktadır (Suschetet, 1975).

Özellikle keçiboynuzunda bulunan %16-20 seviyelerindeki protein asimilasyonunu önleyen yüksek tanen içeriklerinden dolayı meyvenin tüketimi sınırlıdır. Bu yüksek tanen içeriği aynı zamanda aşırı hazımsızlığa neden olmaktadır (Avallone ve Ark., 1997). Zitko ve Rosik (1962) 1 mol tanenin 12 mol proteini bağlayabilme kapasitesi olduğunu bildirmişleridir.

Tanenlerin saydığımız bu olumsuz yönlerinin yanında uygun dozlara kullanımı antimitojenik ve antikanserijenik (Kono ve ark., 1988), antimikrobiyal etkileride (Scalbert, 1991) vardır. İçerisinde yer alan ellagik asit sayesinde kan pıhtılaştırıcı özelliği mevcuttur (Ratnoff ve Crum, 1964). Tannik asit ise böcek ve yılan zehirlerine karşı panzehir olarak kullanılabilen, bunun yanı sıra serum lipit düzeyini düşürmekte, insülin salgılanmasını düzenleyici etkide bulunmaktadır (Kuppusamy ve Das, 1993).

Bu çalışma, yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında günlük hayatımızda bu kadar yaygın kullanılan (dondurma, yoğurt, puding, eritme ve krem peynir, içecekler, ketçap, mayonez, salça ve sos) keçiboynuzu çekirdeğinin antioksidan ve karaciğer koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak üzere planlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Oksidatif stresin alkolle ilişkili karaciğer hasarının patogeneğinde anahtar bir basamak olduğu, alkolün karaciğer hastalıkları riskini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ishii ve ark., 1997; Poli 2000). Ayrıca Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Nordmann ve ark., 1992; Ishii ve ark., 1997). Bir başka çalışmada da aşırı alkol tüketiminin karaciğer dokusunda harabiyete ve birçok olumsuz metabolik değışime neden olduğu ve bu olumsuzlukların alınan doza ve süreye, bireysel dayanıklılığa, diyet ve diğerk faktörlere bağılı olarak değıştiğı bildirilmiştir (Murray ve ark., 1988). Alkole bağılı karaciğer hastalıkları; karaciğer yağlanması, alkolik hepatitis ve karaciğer sirozu olarak tanımlanmaktadır. Karaciğer hücre bütünlüğü etkilendiğinde ve paranzim hücrelerinin dejenerasyonunda serumda AST ve ALT enzim aktivitelerinin yükseldiğı vurgulanmıştır (Karayılıanoğlu ve ark., 1991). Yine başka bir araştırmada (Nishimura ve Teschke, 1982; Teschke ve ark., 1987) alkole bağılı olarak karaciğer ALT ve AST aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir.

Keçiboynuzu, Akdeniz ülkelerinde doğal yayılım göstermekte ve her daim yeşil bir maki türüdür (Calixto ve Cañellas, 1982). Keçiboynuzu meyvesinin yaklaşık %90'ını etli kısım meydana getirir. Bu kısımda sukroz, glukoz, selüloz ve tanen yönünden oldukça zengindir (Rizzo ve ark., 2004). Bu içeriklerinden dolayı, özellikle ülkemizde kışın hem hastalıklardan koruyucu hem de enerji verici olarak pekmez şeklinde doğrudan ya da çeşitli gıdalara karıştırılarak değışik şekillerde tüketilmektedir. Ancak keçiboynuzu bitkisine asıl önem kazandıran meyvenin içerisinde bulunan keçiboynuzu çekirdekleridir. Keçiboynuzu çekirdekleri bir dizi işleme tabi tutularak gıda sanayinde çok önemli bir katkı maddesi olan keçiboynuzu zambına dönüştürülmektedir. Keçiboynuzu çekirdeklerinin endospermilerinden elde edilen bu zambısı madde, başta dondurmalar olmak üzere yoğurt, puding, eritme ve krem peynir, su bazlı jöleler, şekerlemeler, balık ürünleri, içecekler, ketçap, mayonez, salça, unlu mamüller ve dondurulmuş gıdalar gibi birçok ürünün en önemli bileşeni olmaktadır (Coppen, 1995; Batlle ve Tous, 1997). Keçiboynuzu zambısı, gıda endüstrisi dışında kağıt, boya, tekstil ve plastik sanayinde, petrol ve petrokimya, mobilyacılık, kibrit,

deterjan bazı eczacılık ve kozmetik uygulamalarında da kullanılmaktadır (Coppen, 1995; Marakis, 1996; Avallone, 1997; Barracosa ve ark., 2007).

Keçiboynuzu üzerine yapılan çalışmalar genellikle meyve ve içeriği hakkındadır. Makris ve Kefalas (2004) çeşitli çözücü sistemler yardımıyla keçiboynuzu meyvesinden antioksidan özelliği olan polifenolik bileşikleri özütlemişlerdir.

Yine Ayaz ve ark. (2009), ticari ve ev-yapımı keçiboynuzu ununun besin içeriğini analiz etmişlerdir.

Papagiannopoulos ve ark. (2004) keçiboynuzu meyvesinde polifenollerin yüksek performans sıvı kromatografi, UV absorbansı ve elektropray iyon ayırıcı/kütle spektrometri kullanılarak teşhis ve miktar belirleme çalışması yapmışlardır.

Kumazawa ve ark. (2002), olgunlaşmamış keçiboynuzu meyvelerinden elde ettikleri polifenollün β -karotenin bozunmasını engellediğini göstermişlerdir.

Klenow ve ark. (2009), insan kolon kanserinde *in vitro* adenoma hücreleri üzerinde keçiboynuzu özütünün oksidatif stres ve ilaç metabolizmasıyla ilgili kimyasal önleyici potansiyeline sahip olup olmadığı konusunda yaptıkları çalışmada oksidatif stresi baskılayabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmaların dışında keçiboynuzu çekirdeğinin biyokimyasal aktivitesine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmayla keçiboynuzu bitkisinin çekirdek içeriğinin antioksidan ve karaciğer koruyucu özelliklerine ilk kez bakılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller

3.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Araştırmamızın canlı materyali olan 200-300 gr ağırlığında, 5.5-6 aylık, 24 adet sağlıklı (*Wistar albino*) ırkı dişi sıçanlar standart plastik rat kafeslerine yerleştirildi. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı. Bu amaçla kontrol ve tüm deneme grubundaki denekler aynı koşullarda tutuldu. Bitki materyali olarak keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) çekirdeğini (halk arasında harnup olarak da bilinir) Antalya yöresinden temin edilen çeşiti kullanıldı.

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Gerhaeld çalkalayıcı, Nüve NM 110 vorteks, Bosch S 2000 hassas terazi, Chyo JI-180 dijital terazi, sıcak su sanyosu BM 101 Nüve, otomatik pipet Socorex Swiss, uğur derin dondurucu, Orion pH metre 420 A, BHG Hermle Z 320 K soğutmalı santrifüj (14.000 rpm), Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometre, Harris derin dondurucu (-80 °C), Ultrasonic processor homojenizatör, iklim dolabı, kıyma makinası, çekirdek ezme değirmeni, makas, neşter, jilet, plastik tepsiler, Whatman süzgeç kağıdı No.42.

3.1.3. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal maddelerden: Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim kiti Randox-Ransel, Redükte glutasyon (GSH), Okside glutasyon (GSSG), Bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) Tiyobarbitürik asit

(TBA), 1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), Sükroz, Glioksilik asit, Tris (Hidroksi metil amino metan hidroklorit tris HCl), Sodyum sülfat Sigma'dan, Beta Nikotinamidinukleotit fosfat (NADPH), Metafosforik asit, Triklor asetik asit (TCA), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) Sodyum sitrat, Sulfosalisilik asit (SSA), Askorbik asit, ketamin (%10 luk).

3.2. Yemlerin Hazırlanması ve Deney Muamelesi

Antalya yöresinden getirilen keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) çekirdekleri Van tarım il müdürlüğünde bir öğütücü değirmende un haline getirildi. Un haline getirilen keçiboynuzu çekirdekleri laboratuvarında normal sıçan yemine öğütülmüş olan keçiboynuzu çekirdekleri %15 oranında normal yeme karıştırılarak çeşme suyu ile iyice karıştırıldı ve yemler hamur haline getirildi. Hamur haline gelen bu yem, kıyma makinasından geçirilerek pellet haline getirildi. Plastik tepsilere konan bu pellet haline gelen yem 25 °C de iklim dolabında 48 saat bekletildi. İyice kuruyan bu yem daha sonra çıkarılarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi araştırma hastanesindeki deney hayvanları ünitesinde muhafaza edilerek belirlenen sıçan gruplarına gerekli oranda verilmesi sağlandı. Deneme 50 gün devam etti. 24 adet sıçan; kontrol grubu, alkol grubu, keçiboynuzu çekirdeği ilaveli yem + su grubu ile keçiboynuzu çekirdeği ilaveli yem + etil alkol grupları olmak üzere 6'şarlı 4 gruba ayrıldı. Gruplardan kontrol grubu sadece standart sıçan yemi ve su ile beslendi. Alkol grubuna standart sıçan yemi ve etil alkol verildi. KB + su grubuna keçiboynuzu çekirdeği ilaveli yem ve su verildi. KB + alkol grubuna ise keçiboynuzu çekirdeği ilaveli yem ve alkol verildi. Çalışma grubundaki sıçanlara, her gruba ilk gün 200 gram yem ve 500 ml su veya alkol verildi. Daha sonraki her gün bir önceki günden kalan yem tartılarak/ölçülerek her bir grubun günlük yem ve su/alkol tüketimleri kayıt edildi. Ayrıca, ratların net ağırlıkları da 50 gün boyunca her hafta tartılarak kayıt edildi. Deneme aşaması boyunca yeme ve içmelerinde hiçbir kısıtlamaya gidilmeden gerekli miktarda (*Ad libitum*) verilip, ayrıca temizliğe çok dikkat edilerek 50 günlük deneme aşaması bitirildi.

3.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

50 günlük deneme sonunda sıçanlar % 10'luk ketamin ile anesteziye tabi tutularak enjektörler yardımıyla kalplerinden kan alındı. Kanlar EDTA'lı ve biyokimya cam tüplere alındı. EDTA'lı kanlar eritrosit paketleri için kullanılırken, diğer kandan ise serum enzimleri için serum örnekleri hazırlandı. Diğer yandan; 50 gün deneme sonunda sıçanların beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokuları alınarak fizyolojik suyla yıkanıp kurutma kâğıdıyla kurutulduktan sonra analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi. Antioksidan savunma sistemi unsurları ve MDA tayini elde edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantlarında gerçekleştirildi (Xia ve ark., 1994).

3.4. Eritrosit Paketinin Hazırlanması

Yapılan deney için gerekli olan kan enjektörler yardımıyla hayvanların kalbinden EDTA'lı cam tüplere alındı. Bir saat +4 °C'de bekletildikten sonra 3000 rpm'de +4 °C'de soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan plazma atıldı. Altta kalan hacme eşit oranda serum fizyolojik (%0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin yıkanması gerçekleştirildi. Serum fizyolojik eklenen tüpler +4 °C'de 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Eritrosit yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Elde edilen eritrosit paketinde malondialdehit ile redükte glutasyon tayini gerçekleştirildikten sonra süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz ve glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri tayinine kadar eritrosit paketleri derin dondurucuda -20 °C'de muhafaza edildi (Randox Lab., 1996).

3.5. Doku Ekstraksiyon İşlemlerinin Gerçekleştirilmesi

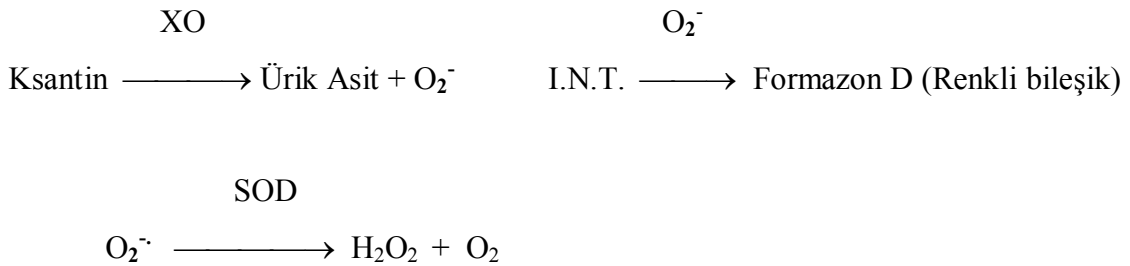
Muamele sonrası derin dondurucuda (-80°C) bekletilen sıçanların beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak çözündürüldü. Dokularda antioksidan enzim ve malondialdehid tayinleri için doku ekstraksiyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Ekstraksiyon için 0.32

mol/L sukroz, 1mmol/L EDTA. 10mm/L Tris HCl (pH 7.4) içeren tampon hazırlanarak 100 mg dokular 25 ml'lik cam beherlerde dijital terazide (Chyo JI-180) tartıldı ve üzerine 5 ml soğuk tampon eklendi. Dokular cam bagetle iyice ezilerek Ultrasonic homojenizatörde 3 dakika homojenize edildi. Ekstrakt hemen 30 dakika 9500 rpm'de soğutmalı santrifüj cihazında (BHG Hermle) +4 °C'de santrifüj edildi. Beyin, böbrek, dalak, kalp ve karaciğer dokusundan elde edilen berrak süpernatantlar analizler için hazır hale getirildi (Xia ve ark., 1994; Marklund, 1990).

3.6. Analizlerin Yapılması

3.6.1. Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Tayini

Prensip: Süperoksid dismutazın rolü, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksid radikalini (O_2^-), hidrojen peroksitle (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu metotla aşağıdaki formülde görüldüğü gibi ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksid radikali, 2-(2-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) ile kırmızı boya formuna dönüşür. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (McCord ve Fridovich, 1969).



| Ayraçlar | <i>Konsantrasyonları</i> |
|------------------|--------------------------|
| 1.Miks Substrate | |
| Ksantin | 0.05 mmol/l |
| I.N.T. | 0.025 mmol/l |
| 2.Tampon | |
| CAPS | 50 mmol/l pH 10.2 |

| | |
|--------------------|-------------|
| EDTA | 0.94 mmol/l |
| 3.Xanthine Oxidase | 80 U/l |
| 4.Standart | 5.70/ml |

Deneyin yapılışı: SOD enzim aktivitesi Randox-Ransod enzim kiti ile Perkin Elmer Lambda 1A UV/VIS spektrofotometrede 505 nm'de 37 °C'de ölçüldü (Randox Lab., 1996). Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı. Eritrosit paketinden 10 µl alınarak 2500 µl 0.01 M fosfat tamponu (pH = 7.0) ilave edilerek 251 katı sulandırıldı (F=251). İnhibisyonun % 30-60 arası olması sağlandı. Küvete aşağıdaki ayıraçlar pipetlendi.

| Örnek | Ayıraç | Körü | Standart | Sulandırılmış |
|---------------------|--------|------|----------|---------------|
| Sulandırılmış Örnek | | | | 20 µl |
| Standart | | | 20 µl | ----- |
| Fosfat Tamponu | 20 µl | | ----- | ----- |
| Karışık Substrat | 680 µl | | 680 µl | 680 µl |

İçerik karıştırılarak ilk absorbans A_1 30 saniye sonra okundu ve eş zamanlı olarak zaman başlatıldı. Son absorbans A_2 3 dakika sonra okundu.

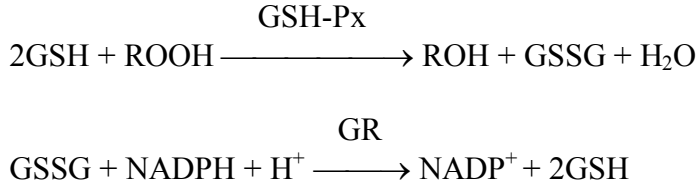
Hesaplama: Spektrofotometreden alınan optik dansite sonuçları aşağıdaki denklemde yerine konarak SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{StdDk} \cdot x100)}{(\Delta A_{Blank Dk.})} = \% \text{ İnhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{ÖrnekDk} \cdot x100)}{(\Delta A_{Blank Dk.})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

SOD enzim aktivitesinin hesaplanması için, standart grafiği elde edildi. Standart grafikten elde edilen $y = 48,85 \ln(x) - 12,218$ formülü ile sulandırma faktörünü de hesaba katılarak SOD aktivitesi U/g tüm doku olarak hesaplandı.

3.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Tayini

Prensip: Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), formülde görülen kumen hidroksidin ile indirgenmiş glutasyonu (GSH) okside eden reaksiyonunu katalizler. Ortamda glutasyon redüktaz (GR) ve nikotin adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) var ise yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), NADPH'ın NADP'ye oksidasyonu ile GSH'a indirgenir (Paglia ve Valentine, 1967).



| Ayırıcılar | Konsantrasyonları |
|-----------------------|-------------------|
| 1.Ayırıcı | |
| Glutasyon | 4.0 mmol/l |
| G.Reduktaz | ≥ 0.5 U/l |
| NADPH | 0.28 mmol/l |
| 2.Tampon | |
| Fosfat | 0.05 mol/l pH 7.2 |
| EDTA | 4.3 mmol/l |
| 3.Kumen Hidroperoksit | 0.18 mmol/l |
| 4.Sulandırma Ayırıcı | |

Deneyin yapılışı: Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile Perkin Elmer Lambda 1A UV/VIS spektrofotometrede 340 nm'de ultraviyole metotla 37 °C'de ölçüldü (Randox Lab., 1996). Analiz materyali olarak, daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı.

Analiz için eritrosit paketinden 10 µl alınarak. 2 ml sulandırma ayırıcı ile sulandırıldı. (F = 201). Küvete aşağıdaki ayırıcılar pipetlendi.

| | Ayıraç Körü | Sulandırılmış Örnek |
|--------------|-------------|---------------------|
| Sulan. Örnek | ----- | 15 µl |
| Distile Su | 15 µl | ----- |
| Ayıraç | 750 µl | 750 µl |
| Kümen | 30 µl | 30 µl |

Küvetler karıştırılarak, örnek ve körün absorbansları 1 dakika sonra okundu. Zaman başlatılmasından, 1 ve 2 dakika sonra absorbanslar tekrar okunarak dakika absorbans değişimi hesaplandı.

Hesaplama: U/g doku veya ml eritrosit paketi = $8412 \times DA \text{ 340 nm / dakika}$. Örnek ve körün U/g tüm doku sonuçları için, örnek değerden (U/g), kör değeri (U/g) çıkarıldı. Sulandırma faktörünü de hesaba katılarak sonuçlar U/g tüm doku veya ml eritrosit cinsinden hesaplandı.

3.6.3. Glutatyon -S-transferaz (GST) Enzim Tayini

Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı. 3 ml quvartz küvette, 340 nm de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Absorbanslar 3 dakika boyunca 15 saniyede bir kaydedildi. Absorbans aralığındaki değişimin Lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tespit edilerek ($EU = 3 (A / 9.6)$) formülden sulandırma faktörünü de hesaba katılarak hesaplamalar yapıldı.

Aşağıdaki tabloda yer alan miktarlar uygun şekilde karıştırılarak ölçüm yapıldı (Habig ve ark., 1981).

| | Kör | Numune | Son Konsantrasyon |
|-------------|--------|--------|-------------------|
| Pbs | 2.7 ml | 2.7 ml | 0.1 M |
| Distile Su | 0.1 ml | | |
| CDNB | 0.1 ml | 0.1 ml | 1 mM |
| GSH | 0.1 ml | 0.1 ml | 1 mM |
| Süpernatant | | 0.1 ml | |

3.6.4. Lipid peroksidasyon (MDA) tayini

Prensip: Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid, tiyobarbiturik asit ile renkli forma girmesi ile ölçülür (Slater, 1984; Sushil ve ark., 1989).

Ayırıklar

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

Deneyin yapılışı: Lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid seviyesi, tiyobarbitürük asit (TBA) reaktifi ile renk reaksiyonu sonucu Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede maksimum 532 nm'de absorbanlar ölçüldü. Bir tüpe ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş eritrosit paketi veya doku süpernatantlarından 200 µl alınarak üzerine 800 µl fosfat tamponu ve 25 µl BHT ile süspanse edildi. Sonra 500 µl % 30'luk TCA eklendi. Tüpler vorteksle karıştırılarak 2 saat -20 °C'de buzdolabında tutuldu. Sonra 15 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'si alınarak başka tüplere aktarıldı. Bunların üzerine 75 µl EDTA Na₂H₂O, 250 µl TBA eklendi. Tüpler vorteksle karıştırıldı ve 15 dakika sıcak su banyosunda (+90°C) tutuldu. Sonra oda ısısına getirilerek 532 nm'de optik dansiteleri (eritrositlerde 532 nm OD den 600 nm OD çıkartılarak hemoglobindeki MDA miktarı ortadan kaldırıldı) yapılarak okundu (Slater, 1984; Sushil ve ark., 1989).

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

A = Absorbans a = Ekstinksiyon katsayısı

b = Işık yolu c = Konsantrasyon

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

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

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

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

$$c = A \times 1 \times F \times 10 / 1.56 = \text{nmol} / \text{ml eritrosit}$$

3.6.5. Redükte glutatyon (GSH) tayini

Prensip: Ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş eritrosit veya dokulardan hazırlanan hemolizat ve süpernatantlarında, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. indirgenmiş glutatyon (GSH), elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu sonucu sarı rengin oluşumu ile ölçüldü. Eritrosit paketi ve süpernatantlarda GSH seviyesinde düşüş olabileceği ihtimaline karşılık 24 saat içerisinde gerçekleştirildi (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988).

Ayırıcılar: 1. **Çöktürücü Çözelti:** 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA (disodyum etilen diamin tetraasetik asit), 30 g NaCl 100 ml'ye distile suda eritilerek tamamlandı. 2. **Fosfat Çözeltisi:** 0.3 M disodyum fosfat distile su ile hazırlandı. 3. **DTNB (Ellman's Ayırıcı):** 40 mg DTNB (5,5'-(2-ditiobis) nitrobenzoik asit), %1 sodyum sitrat, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Deneyin yapılışı: Eritrosit paketi veya doku süpernatantından 200 µl alınarak, 3 ml çöktürücü çözeltisi ile karıştırıldı. 5 dakika bekleme sonrası, karışım watman süzgeç kâğıdından (No.42) süzüldü. Örnek numuneden elde edilen süzüntünün 2 ml'si başka tüpe aktarıldı. Üzerine 8 ml fosfat çözeltisi, 1ml DTNB ayırıcı eklendi. Blank için 2 ml çöktürücü çözeltisi (3 kısım çöktürücü çözelti + 2 kısım distile su), 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB ayırıcı tüpe alınarak hazırlandı. Standart için, 40 mg GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 412 nm'de blanka karşı standart numunelerin optik dansiteler okundu. Sonuçlar mg/g doku olarak hesaplandı (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988).

3.6.6. Glutasyon Redüktaz (GR) Enzim Tayini

Analiz materyali olarak, daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilen eritrosit paketi ve doku süpernatantları kullanıldı. Aşağıdaki tabloda yer alan miktarlar uygun şekilde karıştırılarak ölçüm yapıldı.

| Ölçüm Prosedürü | Kör | Numune |
|----------------------|---------|---------|
| Fosfat Tamponu | 1500 µl | 1500 µl |
| Homojenat Tamponu | 1200 µl | - |
| β-NADPH 2 mM | 150 µl | 150 µl |
| GSSG 20 mM | 150 µl | 150 µl |
| Numune (Süpermatant) | - | 1200 µl |

GR aktivitesi (EU), 340 nm'de dakika başına harcanan NADPH miktarından hesaplandı. 5 dakika boyunca ölçülen absorbansın lineer olan kısmı dakika başına hesaplandı ($A = \epsilon \times b \times c$), (Carlberg ve Mannervik, 1985).

3.7 İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulgular istatistiki olarak değerlendirilerek, aritmetik ortalamaları (X) ve standart sapmaları ($\pm SD$) bulundu. Gruplar arasındaki farkın önemli olup olmadığını tesbit etmek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve ikili grupların kendi aralarında karşılaştırılması için de POST HOC testlerden TUKEY HSD testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Bu istatistiki işlemler Minitab V.15 paket programı ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Günlük yaşantımızda yaygın bir şekilde kullanılan keçiboynuzu çekirdeğinin gerek karaciğer koruyucu etkisinin ve gerekse antioksidan özelliğinin araştırılması amacıyla planlanan bu çalışma sonucu elde edilen bulgular çizelgeler ve şekiller halinde aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği muamelesine tabi tutulan sıçanların karaciğer harabiyet biyobelirteçleri olan serum enzim düzeyleri

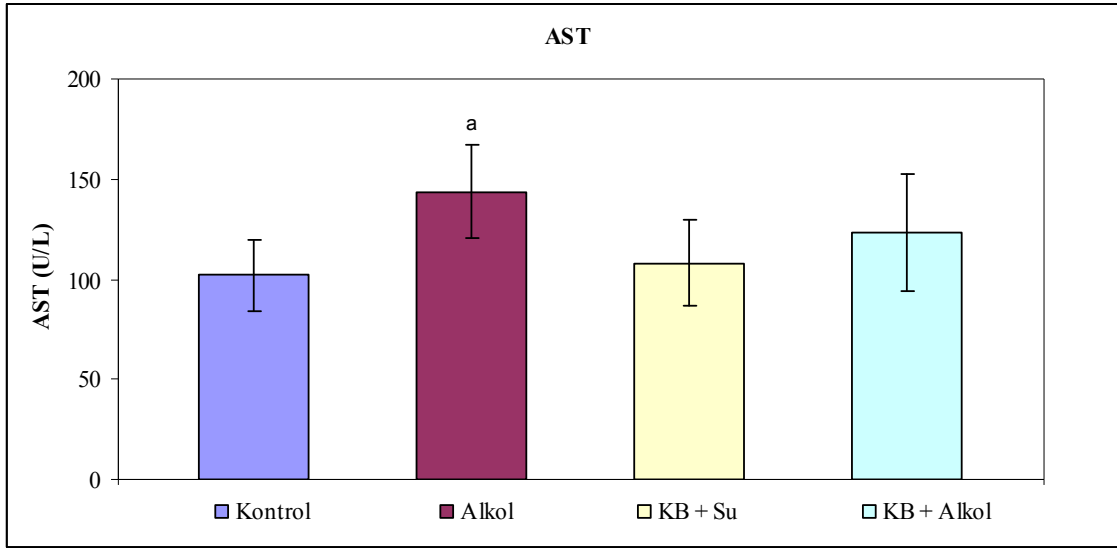
| SERUM ENZİMLERİ | | | | |
|-----------------|------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| SERUM | Kontrol | Alkol | KB+Su | KB+Alkol |
| | X ± SD | X ± SD | X ± SD | X ± SD |
| AST U/L | 102±17,7 | 143,8±22,9 ^a | 108,2±21,3 | 123,2±29,3 |
| ALT U/L | 52,7±4,5 | 78,7±5,4 ^a | 52,7±9,1 ^b | 61±4,8 ^c |
| LDH U/L | 659,8±65,5 | 844,7±83,3 ^a | 653±54 ^b | 575,8±121 ^c |
| ALB U/L | 31,6±1,8 | 31,5±1,2 | 31±1,1 | 30,8±1 |
| TP U/L | 19,5±1,3 | 19,2±0,7 | 18,4±0,7 | 18,7±1,4 |

a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

b: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

c: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

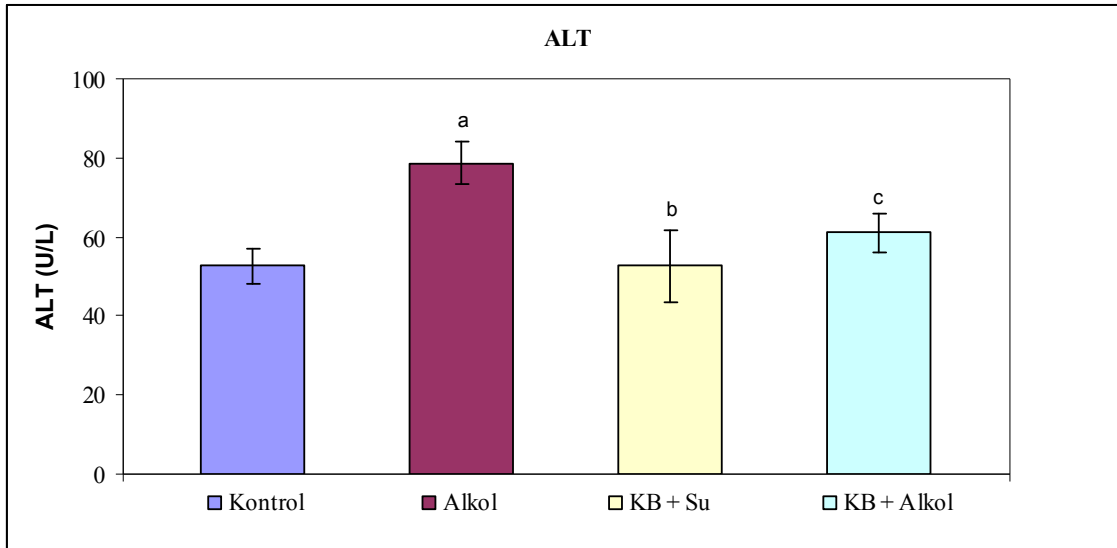
Çizelge 4.1'deki bulgulara göre; AST değerleri Alkol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma (p<0,05) bulunurken, diğer uygulama gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05).



Şekil 4.1 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçiyoynuzu çekirdeğinin AST seviyelerinin karşılaştırılması.

a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.1'deki bulgulara göre; ALT değerleri Alkol grubunda diğer uygulama gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p < 0,05$) bulunurken, diğer uygulama gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında ise bir anlamlılık bulunamamıştır.



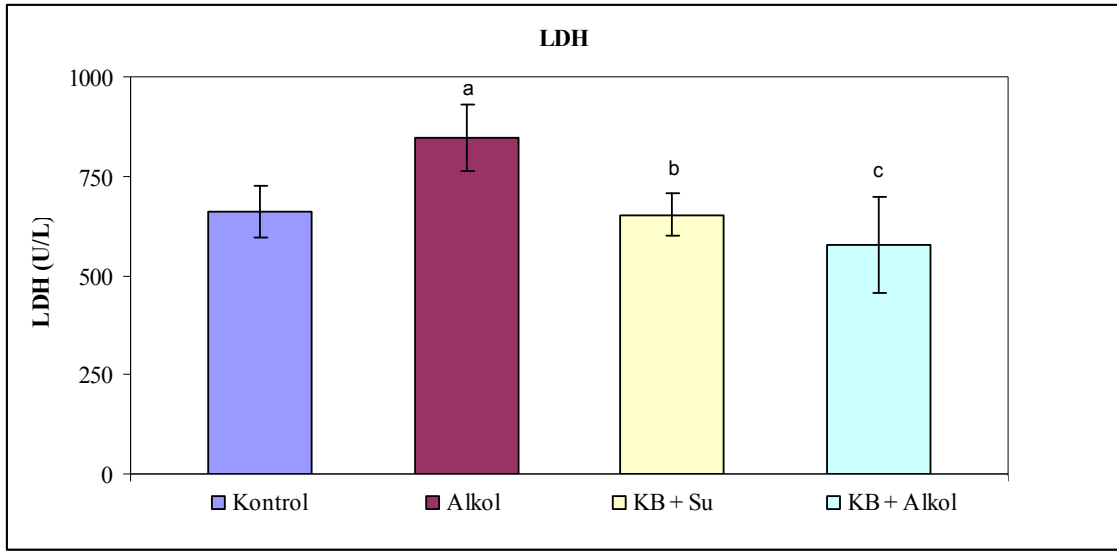
Şekil 4.2 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçiyoynuzu çekirdeğinin ALT seviyelerinin karşılaştırılması.

a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

b: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

c: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.1'deki sonuçlara göre; LDH değerleri alkol grubunun, kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p<0,05$) bulunmuştur. KB + alkol grubunun kontrol grubu ve KB + su grubuna göre LDH değerinde bir azalma bulunmasına rağmen, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu ile KB + su grupları arasında LDH değerlerinde önemli fark bulunamadı.



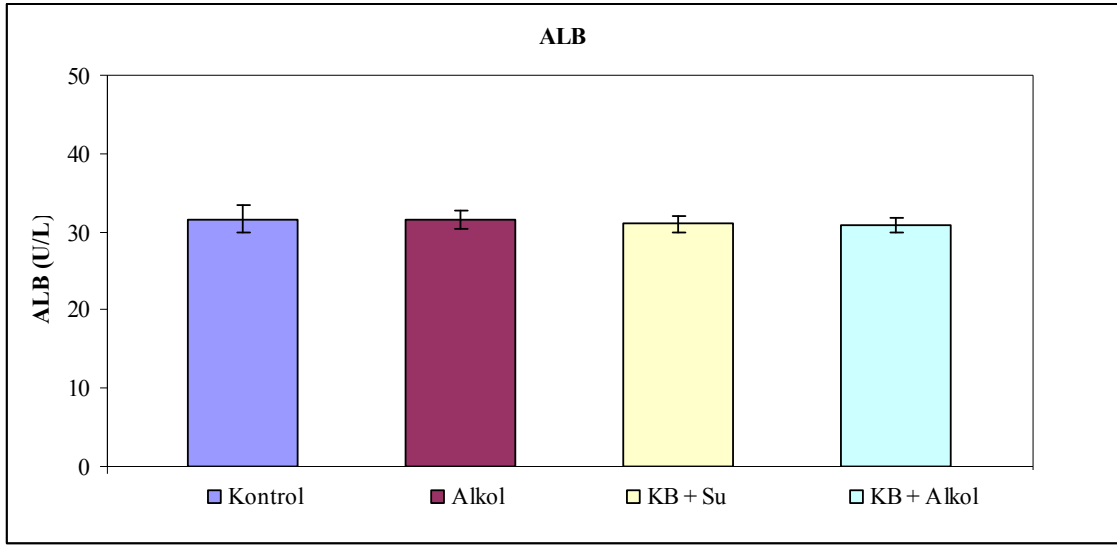
Şekil 4.3 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçiboynuzu çekirdeğinin LDH seviyelerinin karşılaştırılması.

a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

b: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

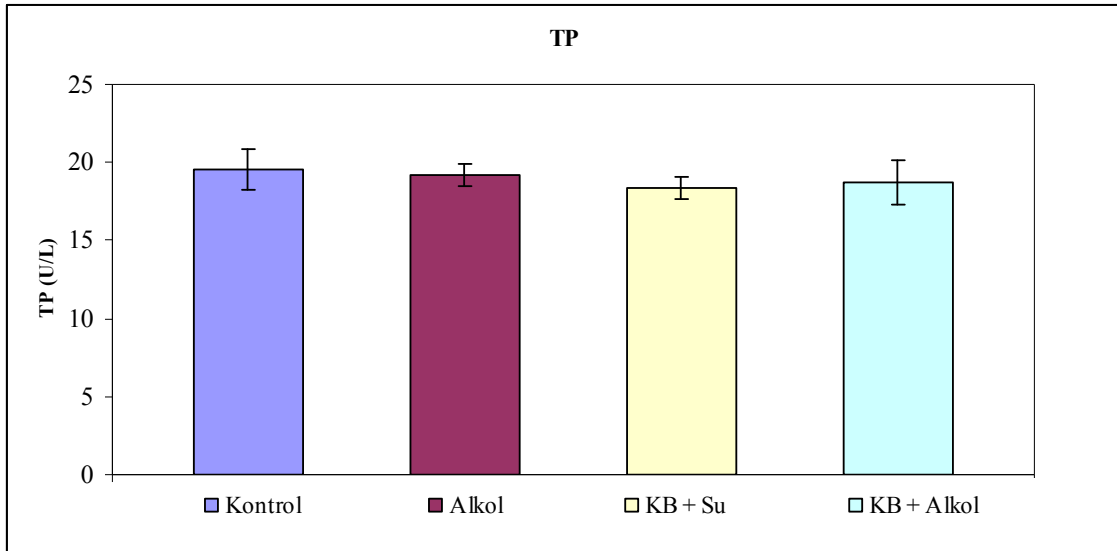
c: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.1'deki sonuçlara göre; ALB değerlerinin uygulama grupları arasındaki karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.4 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçiboynuzu çekirdeğinin ALB seviyelerinin karşılaştırılması.

Çizelge 4.1'deki sonuçlara göre; TP değerlerinin uygulama grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel açıdan herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

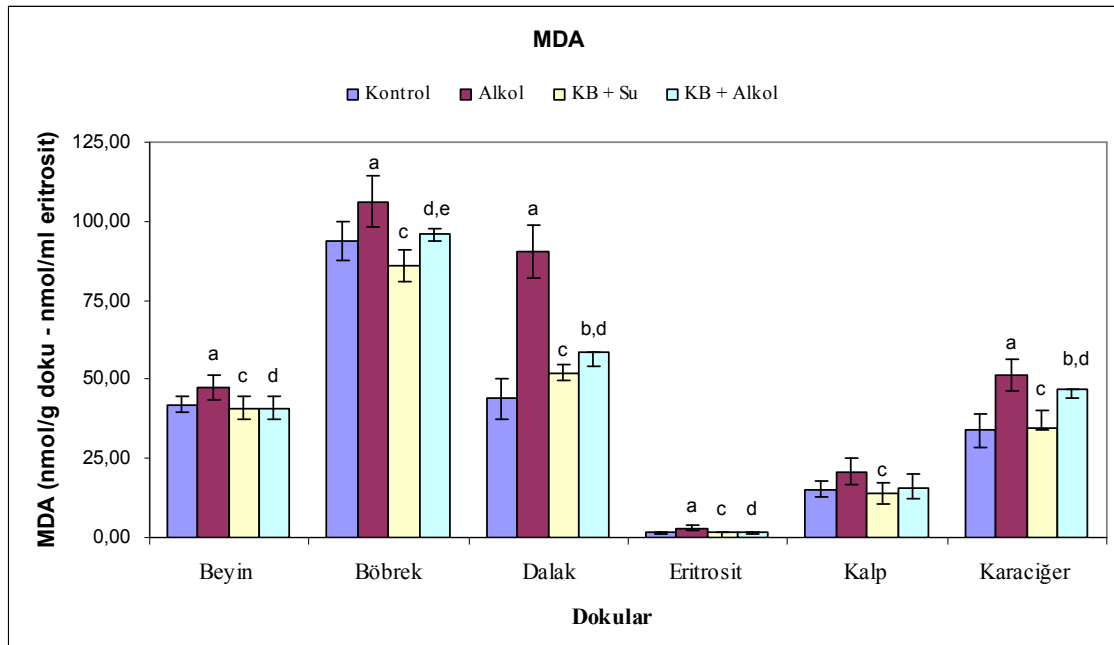


Şekil 4.5 Etil alkol muamelesine tabi tutulan sıçanlarda keçiboynuzu çekirdeğinin TP seviyelerinin karşılaştırılması.

Çizelge 4.2 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki MDA düzeyleri

| MDA | | | | |
|---------------------|------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Dokular | Kontrol | Alkol | KB + Su | KB + Alkol |
| | X ± SD | X ± SD | X ± SD | X ± SD |
| Beyin (nmol/g) | 42,09±2,56 | 47,49±3,86 ^a | 40,9±3,7 ^c | 41,01±3,86 ^d |
| Böbrek (nmol/g) | 93,69±6,01 | 106,21±8,25 ^a | 86,02±5,02 ^c | 95,74±2,17 ^{d,e} |
| Dalak (nmol/g) | 44,03±6,4 | 90,45±8,33 ^a | 52,02±2,52 ^c | 58,5±4,51 ^{b,d} |
| Eritrosit (nmol/ml) | 1,52±0,3 | 3,05±0,7 ^a | 1,42±0,34 ^c | 1,54±0,27 ^d |
| Kalp (nmol/g) | 15,21±2,49 | 20,83±4,15 | 14,03±3,31 ^c | 15,43±3,17 |
| Karaciğer (nmol/g) | 34±5,32 | 51,37±4,92 ^a | 34,64±5,39 ^c | 46,62±2,52 ^{b,e} |

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: KB + Su grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.6 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki MDA düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- e: KB + Su grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.2’de sunulduğu gibi malondialdehit (MDA nmol/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiboynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda (KB + alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 42.09 ± 2.56 , 47.49 ± 3.86 , 40.9 ± 3.7 , 41.01 ± 3.86 ; böbrek dokusunda 93.69 ± 6.01 , 106.21 ± 8.25 , 86.02 ± 5.02 , 95.74 ± 2.17 ; dalak dokusunda 44.03 ± 6.4 , 90.45 ± 8.33 , 52.02 ± 2.52 , 58.5 ± 4.51 ; eritrosit dokusunda 1.52 ± 0.3 , 3.05 ± 0.7 , 1.42 ± 0.34 , 1.54 ± 0.27 ; kalp dokusunda 15.21 ± 2.49 , 20.83 ± 4.15 , 14.03 ± 3.31 , 15.43 ± 3.17 ve karaciğer dokusunda 34 ± 5.32 , 51.37 ± 4.92 , 34.64 ± 5.39 , 46.62 ± 2.52 olarak bulundu.

Bu sonuçlara göre, beyin dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p<0,05$) bulunurken, KB + alkol grubunda ise Alkol grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Böbrek dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p<0,05$) bulunurken, KB + alkol grubunda ise Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, KB + su grubunda KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Dalak dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p<0,05$) bulunurken, KB + alkol grubunda ise Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Fakat KB + alkol grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur ($p<0,05$).

Eritrosit dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma ($p<0,05$) bulunurken, KB + alkol grubunda Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kalp dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur ($p<0,05$).

Karaciğer dokusu MDA değerlerinde Alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Ayrıca KB + alkol grubunda, Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu hesaplandı ($p<0,05$).

Diğer deney gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmalarında, MDA değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.3 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeyleri

| Dokular | GSH | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Kontrol X ± SD | Alkol X ± SD | KB + Su X ± SD | KB + Alkol X ± SD |
| Beyin (mg/g) | 34,14±5,13 | 28,83±0,8 | 37,22±4,18 ^d | 40,35±2,96 ^{c,e} |
| Böbrek (mg/g) | 71,22±4,7 | 76,22±5,52 | 71,53±8,09 | 70,24±2,66 |
| Dalak (mg/g) | 94,62±2,09 | 99,72±3,18 ^a | 102,52±1,16 ^b | 98,98±3,22 ^c |
| Eritrosit (mg/ml) | 1,78±0,08 | 1,84±0,14 | 1,58±0,04 ^{b,d} | 1,7±0,05 |
| Kalp (mg/g) | 78,91±7,26 | 82,93±6,07 | 78,85±7,64 | 68,11±6,26 ^e |
| Karaciğer (mg/g) | 90,64±4,02 | 100,1±3,48 ^a | 84,1±1,1 ^d | 88,29±7,67 ^e |

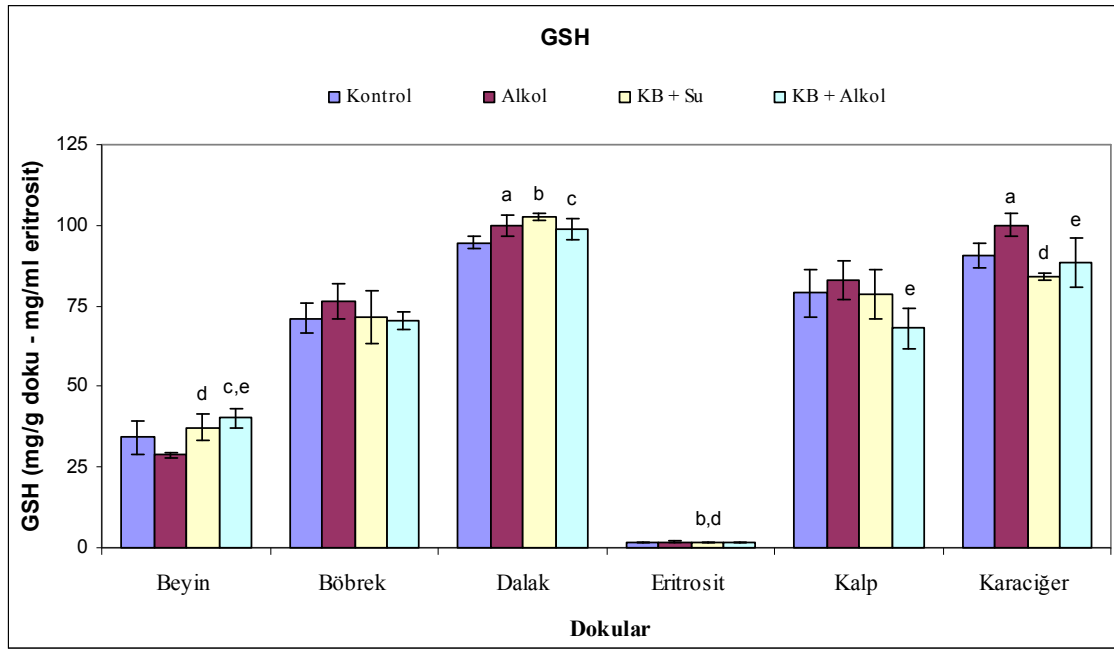
a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

e: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.7 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
- e: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi, redükte glutasyon (GSH mg/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiyoynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiyoynuzu çekirdeği + alkol grubunda (KB + alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 34.14 ± 5.13 , 28.83 ± 0.8 , 37.22 ± 4.18 , 40.35 ± 2.96 ; böbrek dokusunda 71.22 ± 4.7 , 76.22 ± 5.52 , 71.53 ± 8.09 , 70.24 ± 2.66 ; dalak dokusunda 94.62 ± 2.09 , 99.72 ± 3.18 , 102.52 ± 1.16 , 98.98 ± 3.22 ; eritrosit dokusunda 1.78 ± 0.08 , 1.84 ± 0.14 , 1.58 ± 0.04 , 1.7 ± 0.05 ; kalp dokusunda 78.91 ± 7.26 , 82.93 ± 6.07 , 78.85 ± 7.64 , 68.11 ± 6.26 ve karaciğer dokusunda 90.64 ± 4.02 , 100.1 ± 3.48 , 84.1 ± 1.1 , 88.29 ± 7.67 olarak belirlendi.

Bu sonuçlara göre, beyin dokusu GSH değerlerinde KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Fakat Alkol grubunda da KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,05$).

Dalak dokusu GSH değerlerinde kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,05$).

Eritrosit dokusu GSH değerlerinde KB + su grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,05$).

Kalp dokusu GSH değerleri, Alkol grubunda KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu ($p<0,05$).

Karaciğer dokusu GSH değerleri; Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,05$).

Diğer deney grupları arasındaki karşılaştırmada, GSH değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.4 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GR düzeyleri

| Dokular | GR | | | |
|------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| | Kontrol X ± SD | Alkol X ± SD | KB + Su X ± SD | KB + Alkol X ± SD |
| Beyin (U/g) | 1,42±0,23 | 1,57±0,2 | 1,52±0,24 | 1,54±0,21 |
| Böbrek (U/g) | 7,08±0,49 | 7,36±0,33 | 6,15±0,15 ^{b,d} | 7,36±0,19 ^e |
| Dalak (U/g) | 2,35±0,14 | 2,07±0,26 | 2,03±0,37 | 2,03±0,13 |
| Eritrosit (U/ml) | 2,14±0,63 | 1,8±0,79 | 2,43±0,41 | 2,01±0,47 |
| Kalp (U/g) | 0,44±0,08 | 0,45±0,06 | 0,38±0,11 | 0,46±0,06 |
| Karaciğer (U/g) | 4,45±0,35 | 5,9±0,57 ^a | 5,23±0,25 | 5,91±0,8 ^c |

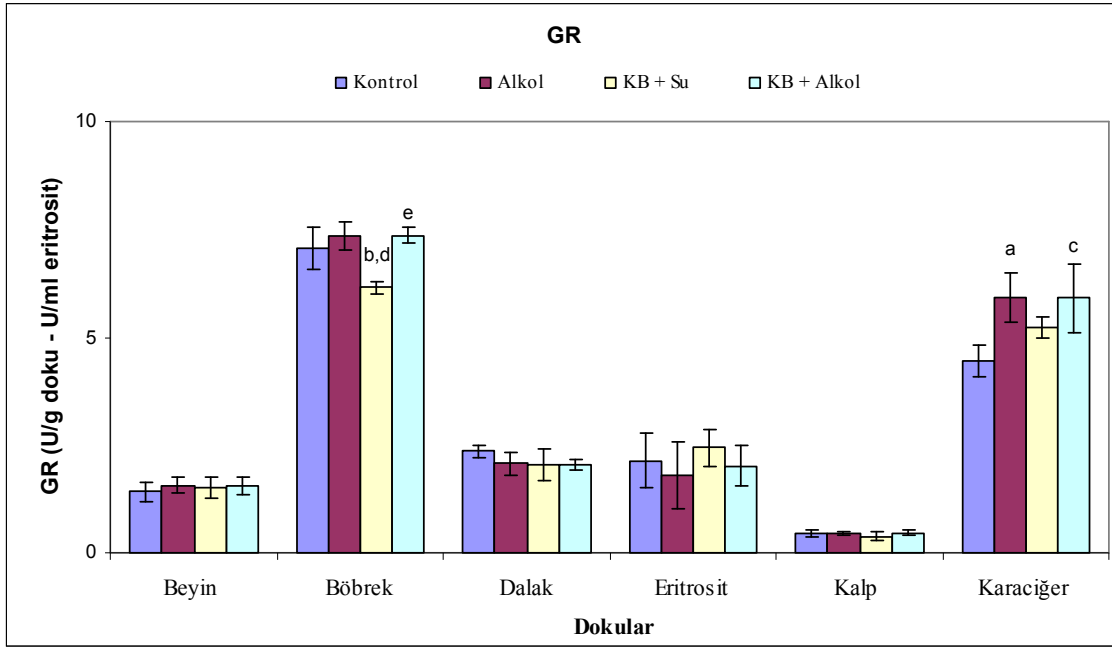
a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.8 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GR düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.4'de, görüldüğü gibi glutasyon redüktaz (GR U/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiyoynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiyoynuzu çekirdeği + alkol grubunda (KB + Alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 1.42 ± 0.23 , 1.57 ± 0.2 , 1.52 ± 0.24 , 1.54 ± 0.21 ; böbrek dokusunda 7.08 ± 0.49 , 7.36 ± 0.33 , 6.15 ± 0.15 , 7.36 ± 0.19 ; dalak dokusunda 2.35 ± 0.14 , 2.07 ± 0.26 , 2.03 ± 0.37 , 2.03 ± 0.13 ; eritrosit dokusunda 2.14 ± 0.63 , 1.8 ± 0.79 , 2.43 ± 0.41 , 2.01 ± 0.47 ; kalp dokusunda 0.44 ± 0.08 , 0.45 ± 0.06 , 0.38 ± 0.11 , 0.46 ± 0.06 ve karaciğer dokusunda 4.45 ± 0.35 , 5.9 ± 0.57 , 5.23 ± 0.25 , 5.91 ± 0.8 olarak tespit edildi.

Bu bulgulara göre, böbrek dokusu GR değerlerinde, KB + su grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunurken ($p < 0,05$), KB + alkol grubunda KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Karaciğer dokusu GR değerleri; Kontrol grubunda Alkol grubuna ve KB + alkol grubuna göre anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,05$).

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada, GR değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.5 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GPx düzeyleri

| Dokular | GPx | | | |
|------------------|---------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| | Kontrol | Alkol | KB + Su | KB + Alkol |
| | X ± SD | X ± SD | X ± SD | X ± SD |
| Beyin (U/g) | 140±7 | 135±13 | 141±10 | 162±7 ^{c,e,f} |
| Böbrek (U/g) | 375±8 | 402±4 ^a | 395±3 ^b | 406±4 ^{c,f} |
| Dalak (U/g) | 406±5 | 395±4 ^a | 411±9 ^d | 395±3 ^{c,f} |
| Eritrosit (U/ml) | 1194±18 | 546±14 ^a | 534±5 ^b | 533±3 ^c |
| Kalp (U/g) | 371±4 | 411±5 ^a | 414±5 ^b | 409±4 ^c |
| Karaciğer (U/g) | 2207±12 | 2365±9 ^a | 2145±12 ^{b,d} | 2322±9 ^{c,e,f} |

a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

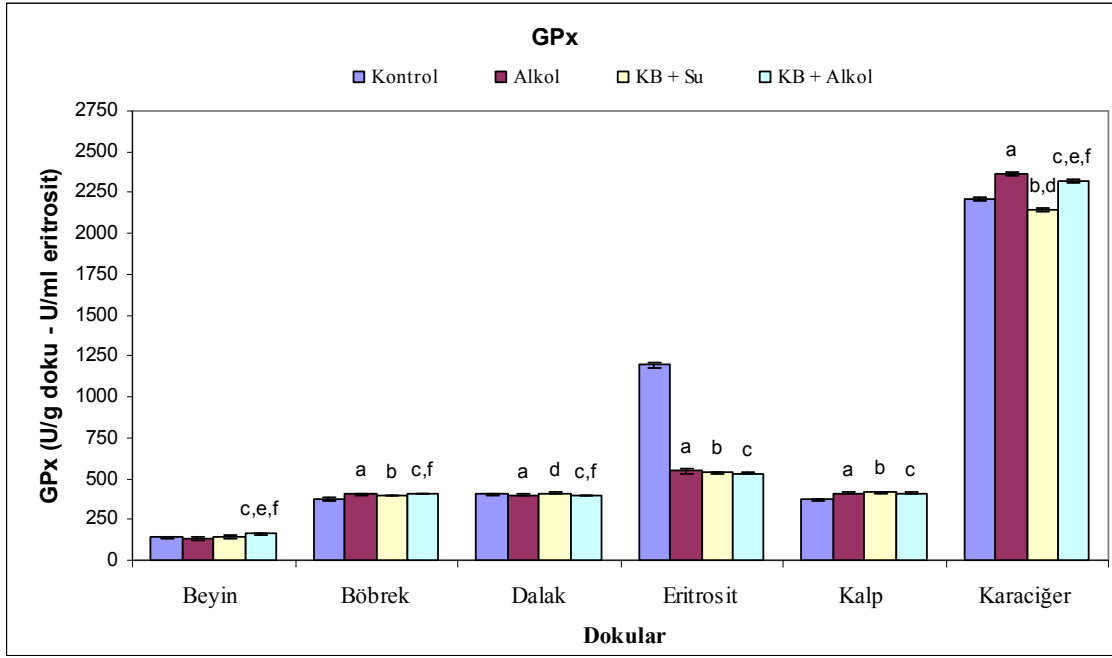
b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

e: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

f: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.9 Etil alkol ve keçiboynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GPx düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- b: Kontrol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- c: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- d: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- e: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- f: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.5’da verildiği gibi, Glutasyon Peroksidaz (GPx U/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiboynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda (KB + alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 140 ± 7 , 135 ± 13 , 141 ± 10 , 162 ± 7 ; böbrek dokusunda 375 ± 8 , 402 ± 4 , 395 ± 3 , 406 ± 4 ; dalak dokusunda 406 ± 5 , 395 ± 4 , 411 ± 9 , 395 ± 3 ; eritrosit dokusunda 1194 ± 18 , 546 ± 14 , 534 ± 5 , 533 ± 3 ; kalp dokusunda 371 ± 4 , 411 ± 5 , 414 ± 5 , 409 ± 4 ; karaciğer dokusunda 2207 ± 12 , 2365 ± 9 , 2145 ± 12 , 2322 ± 9 olarak belirlendi.

Bu bulgulara göre, beyin dokusu GPx değerlerinde KB + alkol grubunda Kontrol grubuna, Alkol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükseliş bulundu ($p < 0,05$).

Böbrek dokusu GPx değerlerinde, Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Fakat KB + alkol grubunda KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$).

Dalak dokusu GPx değerleri; Kontrol grubunda Alkol grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). Ayrıca, KB + su grubunda da Alkol grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş belirlendi ($p<0,05$).

Eritrosit dokusu GPx değerlerinde, Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,05$).

Kalp dokusu GPx değerlerinde, Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p<0,05$).

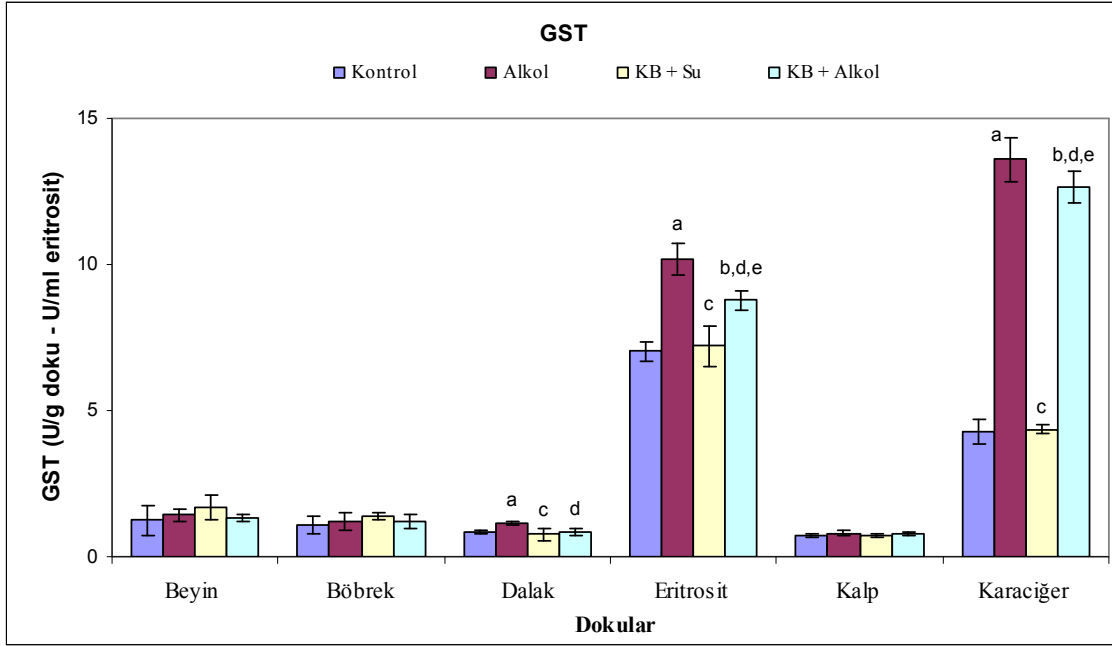
Karaciğer dokusu GPx değerleri; Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,05$). Yine, KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre anlamlı bir yükseliş belirlenirken ($p<0,05$), KB + su grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GPx değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.6 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GST düzeyleri

| Dokular | GST | | | |
|------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Kontrol X ± SD | Alkol X ± SD | KB + Su X ± SD | KB + Alkol X ± SD |
| Beyin (U/g) | 1,25±0,51 | 1,42±0,23 | 1,69±0,41 | 1,33±0,13 |
| Böbrek (U/g) | 1,1±0,29 | 1,21±0,28 | 1,36±0,12 | 1,21±0,25 |
| Dalak (U/g) | 0,86±0,07 | 1,16±0,06 ^a | 0,77±0,21 ^c | 0,82±0,12 ^d |
| Eritrosit (U/ml) | 7,02±0,35 | 10,18±0,55 ^a | 7,2±0,67 ^c | 8,77±0,34 ^{b,d,e} |
| Kalp (U/g) | 0,71±0,07 | 0,81±0,1 | 0,72±0,08 | 0,79±0,07 |
| Karaciğer (U/g) | 4,28±0,44 | 13,61±0,75 ^a | 4,36±0,13 ^c | 12,65±0,52 ^{b,d,e} |

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.10 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki GST düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
 e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Çizelge 4.6'de görüldüğü gibi, Glutatyon S-transferaz (GST U/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiyoynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiyoynuzu çekirdeği + alkol grubunda (KB + alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 1.25 ± 0.51 , 1.42 ± 0.23 , 1.69 ± 0.41 , 1.33 ± 0.13 ; böbrek dokusunda 1.10 ± 0.29 , 1.21 ± 0.28 , 1.36 ± 0.12 , 1.21 ± 0.25 ; dalak dokusunda 0.86 ± 0.07 , 1.16 ± 0.06 , 0.77 ± 0.21 , 0.82 ± 0.12 ; eritrosit dokusunda 7.02 ± 0.35 , 10.18 ± 0.55 , 7.20 ± 0.67 , 8.77 ± 0.34 ;

kalp dokusunda 0.71 ± 0.07 , 0.81 ± 0.1 , 0.72 ± 0.08 , 0.79 ± 0.07 ve karaciğer dokusunda 4.28 ± 0.44 , 13.61 ± 0.75 , 4.36 ± 0.13 , 12.65 ± 0.52 olarak bulundu.

Bu bulgulara göre, dalak dokusu GST değerlerinde, Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$).

Eritrosit dokusu GST değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre anlamlı bir yükseliş bulundu ($p<0,05$). Ayrıca KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Karaciğer dokusu GST değerlerinde, Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + su grubuna ve KB + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulundu ($p<0,05$). Aynı şekilde KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme belirlendi ($p<0,05$).

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GST değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.7 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki SOD düzeyleri

| Dokular | SOD | | | |
|------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Kontrol X \pm SD | Alkol X \pm SD | KB + Su X \pm SD | KB + Alkol X \pm SD |
| Beyin (U/g) | 1692 \pm 37 | 1740 \pm 28 | 1710 \pm 119 | 1749 \pm 24 |
| Böbrek (U/g) | 1768 \pm 144 | 1581 \pm 49 | 1732 \pm 204 | 1676 \pm 42 |
| Dalak (U/g) | 2024 \pm 29 | 1905 \pm 46 ^a | 2020 \pm 55 ^c | 1982 \pm 58 |
| Eritrosit (U/ml) | 2171 \pm 27 | 2072 \pm 38 ^a | 2161 \pm 15 ^c | 2105 \pm 32 ^{b,e} |
| Kalp (U/g) | 1981 \pm 44 | 1765 \pm 48 ^a | 1945 \pm 42 ^c | 1812 \pm 33 ^{b,e} |
| Karaciğer (U/g) | 1795 \pm 51 | 1411 \pm 26 ^a | 1742 \pm 55 ^c | 1639 \pm 51 ^{b,d,e} |

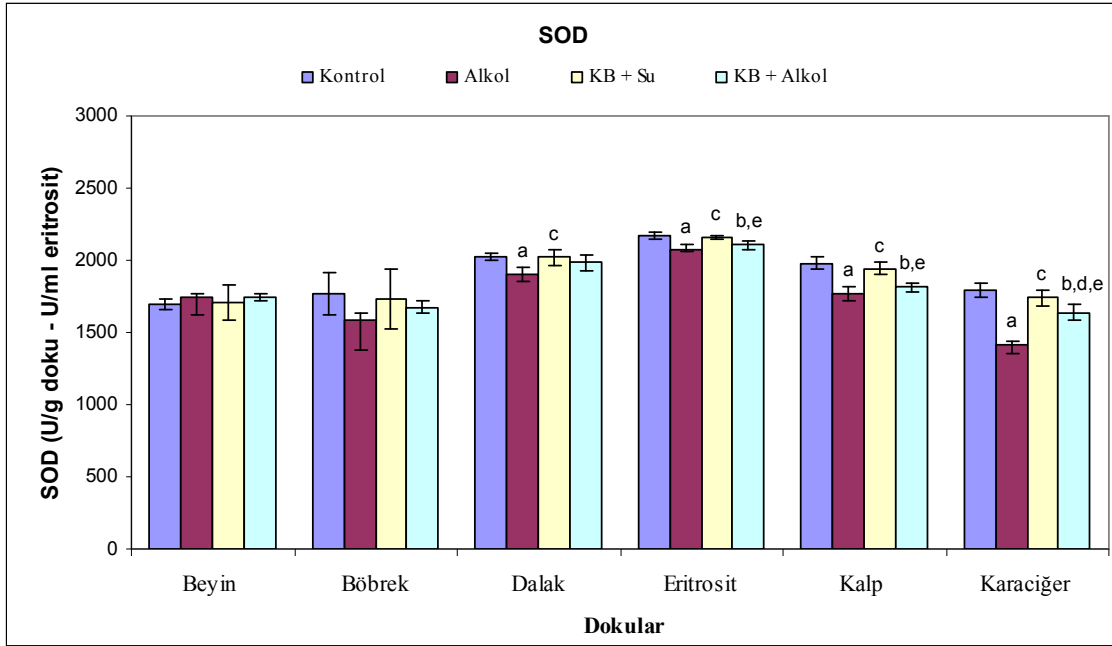
a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.11 Etil alkol ve keçiyoynuzu çekirdeği uygulanan sıçanların çeşitli dokularındaki SOD düzeylerinin karşılaştırılması.

- a: Kontrol grubu ile Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- b: Kontrol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- c: Alkol grubu ile KB + Su grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- d: Alkol grubu ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
- e: KB + Su ile KB + Alkol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi, Süperoksit Dismutaz (SOD U/g) için ortalama ve standart sapmalar ($X \pm SD$), Kontrol grubu, Alkol grubu, Keçiyoynuzu çekirdeği + su grubu (KB + su) ve Keçiyoynuzu çekirdeği + alkol grubu (KB + alkol) sırasıyla, beyin dokusunda 1692 ± 37 , 1740 ± 28 , 1710 ± 119 , 1749 ± 24 ; böbrek dokusunda 1768 ± 144 , 1581 ± 49 , 1732 ± 204 , 1676 ± 42 ; dalak dokusunda 2024 ± 29 , 1905 ± 46 , 2020 ± 55 , 1982 ± 58 ; eritrosit dokusunda 2171 ± 27 , 2072 ± 38 , 2161 ± 15 , 2105 ± 32 ; kalp dokusunda 1981 ± 44 , 1765 ± 48 , 1945 ± 42 , 1812 ± 33 ve karaciğer dokusunda 1795 ± 51 , 1411 ± 26 , 1742 ± 55 , 1639 ± 51 olarak tespit edildi.

Bu bulgulara göre, dalak dokusu SOD değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,05$).

Eritrosit dokusu SOD değerlerinde, Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,05$). Yine KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir duşuş tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Kalp dokusu SOD değerleri; Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış belirlendi ($p < 0,05$). Ayrıca KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir duşuş bulunmuştur ($p < 0,05$).

Karaciğer dokusu SOD değerleri; Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görüldü ($p < 0,05$). Yine KB + alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilirken ($p < 0,05$), Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada SOD değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada etkileri araştırılan etil alkolün ve fonksiyonel gıda olan keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) çekirdeğinin seçiliş sebebi kısaca şöyle açıklanabilir: Yurdumuzda sıkça kullanılan etil alkol ağız, solunum, deriye temas ve gıda zinciri yollarıyla canlı bünyesine girebildikleri ve canlı üzerindeki toksik etkileri literatürlerden anlaşılmaktadır. Burada etil alkolün toksik etkilerinin sonucu olarak; klinik anlam ve önemleri olan karaciğer harabiyeti göstergesi olabilecek serum enzimleri ile oksidatif stresin önemli parametrelerinde meydana gelebilecek olumsuz değişikliklere karşı Antalya ilimizin yöresel bir maki türü olan meyvesiyle ünlü keçiboynuzu çekirdeğinin karaciğer koruyucu etkileri ile antioksidan rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada oksidatif stresi oluşturmak için etil alkolün seçilme sebebi; etil alkolün ağız yoluyla canlı bünyesine kolaylıkla girebilmesi ve canlılarda deneysel karaciğer harabiyeti ve oksidatif stresi oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılan peroksidant madde olmasıdır (Aykaç ve ark., 1985; Sonde ve ark., 2000; Kolankaya ve ark., 2002). Ayrıca Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Nordmann ve ark., 1992; Ishii ve ark., 1997). Bir başka çalışmada da aşırı alkol tüketiminin karaciğer dokusunda harabiyete ve birçok olumsuz metabolik değişime neden olduğu ve bu olumsuzlukların alınan doza ve süreye, bireysel dayanıklılığa, diyetle ve diğer faktörlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Murray ve ark., 1988). Ülkemizde fazla tüketilen etil alkolün ve fonksiyonel gıda olan keçiboynuzu çekirdeğinin subkronik uygulamalarına maruz bırakılan sıçanların serum ve çeşitli dokularından alınan örneklerde; etil alkolün karaciğer harabiyet ve oksidatif stres etkilerinin göstergesi ve etil alkolün oluşturacağı olumsuz etkilerine karşı keçiboynuzu çekirdeğinin karaciğer koruyucu etkisi ve antioksidan rolü olarak değerlendirilebilecek biyobelirteçlerden serum aspartate aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim seviyeleri ve kan protein değerlerinden Albumin (ALB) ve Total protein (TP) tespit edildi. Ayrıca çeşitli dokularda antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz,

glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz, glutasyon redüktaz aktiviteleri ve glutasyon düzeyleri ile lipid peroksidasyonu (Malondialdehit) seviyesine bakıldı. Bu parametrelerin seçiliş nedeni ise etil alkolün moleküler toksisitesini ve bu fonksiyonel gıdaların gıda biyokimyası açısından sıcakkanlı canlılar üzerindeki iyileştirici özelliklerini ortaya koymak açısından önem taşımaktadır. Çalışmada Rat kullanılmasının nedeni; fareden sonra araştırmalarda en çok kullanılan omurgalı hayvandır. Ratlar, temel tıp, ilaç, gıda, davranış ve toksisite çalışmalarında kullanılmaktadır (Van Zutphen ve ark., 2001).

Yapılan çalışmada analiz edilen parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli önlemler alındı. Dolayısıyla, kontrol ve tüm deneme gurubundaki denekler aynı şartlarda tutuldu. Çalışmada kullanılan metotların seçilmesinin sebebi, hem daha az kimyasal madde gerektirmekte hem de laboratuvarlarımızın mevcut imkânlarına nispeten daha uygun ve daha kolay olmasından kaynaklanmaktadır. Keza, çalışmalar pek çok dokuda yapıldığından kullanılan fonksiyonel maddelerin etkisini sağlıklı bir sonuca kavuşturulduğu kanaatindeyiz. Karaciğer harabiyetinin göstergesi olan serum enzim düzeyleri Çizelge 4.1'de; çeşitli dokulardaki uygulama gruplarının MDA aktivite değişiklikleri Çizelge 4.2'de; GSH aktivite değişiklikleri Çizelge 4.3'te; GR aktivite değişiklikleri Çizelge 4.4'te; GST aktivite değişiklikleri Çizelge 4.5'te; GSH-Px aktivite değişiklikleri Çizelge 4.6'da ve SOD aktivite sonuçları Çizelge 4.7'de görüleceği gibi etil alkolün, keçiyoynuzu çekirdeğinin muameleleri sonrası; serum enzim seviyeleri ile beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokusunun GSH düzeylerinde, MDA içerikleri ile GR, GST, GSH-Px ve SOD gibi önemli antioksidan enzim aktivitelerinde önemli değişimler ortaya çıkmıştır.

Deneme sürecinin sonunda yapılan ölçümlere göre, kontrol grubu ile KB + su grubundaki sıçanların ağırlıklarında artma tespit edilirken, alkol grubu ile KB + alkol grubundaki sıçanların ağırlıklarında ise azalma görüldü.

Elde edilen bulgulara göre; Serum enzimlerinden AST düzeylerinin çizelge 4.1'de incelenmesinde Alkol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, diğer uygulama gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır. Ancak istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunmasada keçiyoynuzu çekirdeği + alkol grubunda, alkol grubuna göre bir düşüş

tespit edilmiştir. ALT düzeylerinin Alkol grubunda kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, Keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış bulunmuştur. Diğer uygulama gruplarının karşılaştırılmasında ise istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır. LDH düzeylerinin Alkol grubunda kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, Keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunmuştur. Diğer uygulama gruplarının karşılaştırılmasında ise istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır. Alkol metabolizmasının gerçekleştiği başlıca organ karaciğerdir ve bu yüzden çeşitli fonksiyonel ve dönüşümsüz değişiklikler için duyarlıdır. Alkole bağlı karaciğer hastalıkları; karaciğer yağlanması, alkolik hepatitis ve karaciğer sirozu olarak tanımlanmaktadır. Karaciğer hücre bütünlüğü etkilendiğinde ve paranzim hücrelerinin dejenerasyonunda serumda AST ve ALT enzim aktivitelerinin yükseldiği vurgulanmıştır (Karayılıanoğlu ve ark., 1991). Bazı araştırmacılar (Nishimura ve Teschke, 1982; Teschke ve ark., 1987) alkole bağlı olarak karaciğer ALT ve AST aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırmada serum AST ve ALT aktivitesinde artış saptanmıştır ve bu da Nishimura ve Teschke (1982)'nin ve Teschke ve ark., (1987)'da yapılan çalışmadaki literatürlere benzerlik göstermektedir. Serum ALT ve AST'deki artış, Özmen ve ark. (1988)'nin "transaminazlar hepatositlerin direkt hasara uğraması sonucu kan dolaşımına geçerler ve kandaki düzeyleri yükselir" görüşü ile açıklanabilir. Aynı şekilde LDH aktvitesindeki değişimin Büyükbaş ve İnal (2006)'ın yaptığı çalışmayla paralellik göstermektedir.

Kan protein değerlerinden ALB ve TP de ise uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun nedeni, yarı ömrünün yaklaşık 20 gün olması nedeniyle tayin edilen serum ALB düzeyi, o anki gerçek durumu yansıtmamış olmasından kaynaklanabilmektedir. Bunun yanı sıra volüm değişiklikleri de serum ALB düzeyini etkilemektedir. Bu nedenlerden dolayıdır ki, serum ALB düzeyi akut karaciğer hastalıklarında karaciğerin protein sentez yeteneğinin tek başına güvenilir bir göstergesi olmayabilir (Skrede ve ark., 1973). Ayrıca albumin sentezi beslenme durumu, alkol kullanımı, hormonal denge ve ozmotik basınç değişikliklerinden de etkilenebilmektedir (Rothschild ve ar., 1988). Çalışmada oksidatif

stres oluşturmak için kullanılan alkolün bu değerler üzerinde istatistiksel açıdan olumsuz etkiler göstermiş olabilir.

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki lipid peroksidasyon (Malondialdehit-MDA) sonuçları çizelge 4.2’de sunuldu. Çizelgede de görüleceği gibi, keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı lipid peroksidasyon özelliğinin çeşitli dokularda farklı etkilere neden oldukları gözlemlendi.

Çizelge 4.2’deki bulgulara göre beyin dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda ise etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Böbrek dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda ise etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca keçiboynuzu çekirdeği + su grubunda keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Dalak dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda ise etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur.

Eritrosit dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda ise etil alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Kalp dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur.

Karaciğer dokusu MDA değerlerinde etil alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu çekirdeği + su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu. Ayrıca keçiboynuzu çekirdeği + alkol grubunda, kontrol grubuna ve keçiboynuzu + su grubuna göre de istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu.

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada MDA değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan ÇDYA'nin (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında), serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (Freeman ve Crapo, 1982; Aleynik ve ark., 1997). ÇDYA'nin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (Akkuş, 1995). Devam eden zincir reaksiyon ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan MDA'ya dönüşürler (Valko ve ark., 2007; Karihtala ve Soini, 2007). Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda SOR'un arttığını gösterir (Von Sonntag, 2006). MDA olduğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Hücre içine girince birçok yapı için zararlı etki gösterir (Gilbert ve Colton, 1999). Prensipte olarak yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbiturik asit ile renkli forma girmesi ile ölçülür (Slater, 1984; Sushil ve ark., 1989). Alkol tüketiminin karaciğer ve karaciğer dışı dokularda oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı, bu durumun kompleks ve interaktif bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Ishii ve ark., 1997; Nordmann ve ark., 1992).

Yapılan araştırmada alkol kullanan etil alkol grubunda MDA seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı artması manidardır. Primer hepatosit rat kültürlerinde etanol metabolizmasının serbest MDA düzeylerini dolayısıyla lipid peroksidasyonunu artırdığı (Sergent, 1995), 15 ay süreyle etanol verilen ratlarda ise hepatik mikrozomal MDA oluşumunun arttığı (Wisniewska-Knyp, 1994), Lindi ve ark., (1999)'nın kronik etil alkol alan sıçalarda lipid peroksidasyonu düzeyindeki duyarlılıklarında artış saptamışlardır. Çalışmada eritrosit MDA aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlılık bulunmasına karşın, MDA seviyeleri oldukça düşüktür. Bu da daha önce yapılan bir in vitro çalışmada etanolün eritrositlerde metabolize olmadığı sonucuyla paralellik göstermektedir (Tyulina ve ark., 2002). Keçiboynuzu çekirdeği katkılı yemlerle beslenen sıçanlarda MDA değerleri etil alkol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Etkileri incelenen keçiboynuzu çekirdeğinin lipid peroksidasyonunu azaltabileceği sonucuna varılabilir.

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki redükte glutasyon (GSH) sonuçları çizelge 4.3’de sunuldu. Çizelgede görüleceği gibi keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı antioksidan özelliğinin çeşitli dokularda farklı etkilere neden olduğu gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre beyin dokusu GSH değerlerinde KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu. Ayrıca Alkol grubunda KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulundu.

Dalak dokusu GSH değerlerinde kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu görüldü.

Eritrosit dokusu GSH değerlerinde KB + Su grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görüldü.

Kalp dokusu GSH değerlerinde Alkol grubunda KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu.

Karaciğer dokusu GSH değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış tespit edildi. Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GSH değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

GSH, glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid antioksidandır (Levine ve Kidd, 1986). Biyolojik olarak iki önemli yapıyı (tiyol grubu ve γ -glutamin bağı) yapısında bulundurur. Yapısındaki sisteinin tiyol grubundan ve yüksek konsantrasyonundan dolayı (0.1-10 mM) hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutasyon’un %99’dan fazlası indirgenmiş formda bulunur (Meister, 1983; Meister, 1995). GSH-peroksidaz reaksiyonu için zorunlu bir co-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu nedenle $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ ve 1O_2 ile reaksiyona girerek onları nötralize eder (Levine ve Kidd, 1986). GSH’in yüksek konsantrasyonları ve GSSG’nin düşük düzeyleri canlıların yaşamları için gereklidir (Erenel ve ark., 1993). Burada yapılan çalışmada da alkol verilen bazı grupların dokularında GSH’in yüksek olması doku bütünlüğünü koruyucu bir adaptasyon olabileceği, bununla birlikte bazı dokularda da keçiboynuzu çekirdeği + su ve keçiboynuzu çekirdeği + alkol gruplarının diğer gruplardan anlamlı olarak GSH’in yüksek çıkması bu uygulamaların antioksidan

savunma mekanizmasına katkıda bulunduğu düşünülebilir. GSH, oksidazlar tarafından protein sülfidlerine tercih edilen bir substrat olup (Erenel ve ark., 1993), proteinlerdeki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso ve Clarkson, 2003). Kronik alkole maruz kalan hayvanlarda ve alkoliklerde önemli miktarda 1-OH etil serbest radikali oluşmaktadır. OH etil radikali kovalent olarak yapı ve fonksiyonlarını etkilediği makromoleküllere bağlanabildiği gibi GSH ve diğer hücreyel tiyollerle de etkileşebilir. Bu şekilde hücre içi GSH havuzunun tüketimi ve hücreyel redoks eşitliğinin bozulmasına yol açarak ROT oluşumuna katkı yaptığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Morimoto ve ark., 1995; Albano ve ark., 1996). Bu sonuç sunulan bu çalışmanın sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin etkisi altında yaygınlaşan oksidatif stresin değiştirilmesi yönünde GSH'ın kullanılması, eritrosit GSH seviyesindeki azalmaya neden olabilir. GSH'da görülen bu azalma oksidatif stres riskini artırıyor olabilir (Halliwell, 1995).

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki glutatyon redüktaz (GR) sonuçları çizelge 4.4'de verildi. Çizelgede görüleceği gibi keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı antioksidan özelliği çeşitli dokularda farklı etkilere neden olmuştur.

Bu bulgulara göre böbrek dokusu GR değerlerinde KB + Su grubunda Kontrol grubuna ve Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunurken, KB + Alkol grubunda KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Karaciğer dokusu GR değerlerinde Kontrol grubunda Alkol grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görüldü. Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GR değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

H₂O₂ ve diğer hidroperoksidler glutatyon peroksidaz vasıtasıyla indirgenirken, glutatyonun redükte formu (GSH) kullanılır (Akkuş, 1995). GPx, H₂O₂'yi yüksek özgüllük ile katalizleyerek detoksifiye ederken tepkimeye redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) yükseltgenir ve sonuçta H₂O₂ suya indirgenir. GSSG ise glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redükte hale çevrilir (Urso ve Clarkson, 2003). GR aktivitelerindeki indüklemeye oksidatif streslerin potansiyel biyokimyasal indikatörüdür. Alkol gruplarındaki GR artışı dokuların GSH seviyelerindeki artışla paralellik göstermektedir. GR'nin sürekli olarak

okside glutasyonu redükte glutatyona indirgemesindeki hummalı çalışmayı destekler niteliktedir.

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki glutasyon peroksidaz (GPx) sonuçları çizelge 4.5’de sunuldu. Çizelgede belirtildiği gibi keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı antioksidan özelliğinin çeşitli dokularda farklı etkilere neden olduğu gözlemlendi.

Bu verilere göre, beyin dokusu GPx değerlerinde KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna, Alkol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükseliş bulundu.

Böbrek dokusu GPx değerlerinde Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunmuştur. Ayrıca KB + Alkol grubunda KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu.

Dalak dokusu GPx değerlerinde Kontrol grubunda Alkol grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş görülmüştür. Yine KB + Su grubunda da Alkol grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunmuştur.

Eritrosit dokusu GPx değerlerinde Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur.

Kalp dokusu GPx değerlerinde Kontrol grubunda Alkol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlemlendi.

Karaciğer dokusu GPx değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunmuştur. Yine KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunurken, KB + Su grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulunmuştur.

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GPx değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit (O_2^{\cdot}) molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri arasında yer alır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Reaksiyon sonucu radikal

olmayan ürünler oluştuğu için bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir (Halliwell, 1984; McCord, 1993). GPx, peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek; eritrosit, zar lipidleri, hücre zarı, selluler ve subselluler membranların oksidatif etkiden korunmasını sağlar (Oldfield, 1987). Katalaz, H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkili temizleme sağlar (Halliwell, 1974). Ancak ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan glutatyon peroksidaz (GPx) gibi diğer antioksidan enzimler devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (Dat ve ark., 2000). KAT ve GPx enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık gösterirler. GPx enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunur (Gilbert ve Colton, 1999) ve kofaktör olarak GSH'ı kullanmaktadır (Barber ve Donohue, 1998). KAT enzimi peroksizomlarda bulunmaktadır (Karihtala ve Soini, 2007). Detoksifikasyon olaylarının en çok karaciğerde olduğunu düşünüldüğünde yapılan çalışmada GPx seviyesinde en çok karaciğerde olduğu şekil 4.9'da da görülmektedir. Alkol kullanan grupların karaciğer GPx değerleri alkol kullanmayan gruplara göre anlamlı olarak artmaktadır. Bu da bize detoksifikasyon olaylarının arttığını düşündürmektedir. Artmış oksidatif stres bu enzimin yapımını uyarabilir. Eritrosit kontrol grubundaki aşırı artışa bir anlam yüklenememiştir.

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki glutatyon peroksidaz (GST) sonuçları çizelge 4.6'de sunuldu. Çizelgede görüleceği gibi, keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı antioksidan özelliğinin çeşitli dokularda farklı etkilere neden oldukları gözlemlendi. Bunun nedeni her dokunun fizyolojik olarak değişik yapıda ve savunma sistemi açısından farklı etkiler göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.

Bu sonuçlara göre dalak dokusu GST değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu.

Eritrosit dokusu GST değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükseliş bulundu. Bunun yanı sıra KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulundu.

Karaciğer dokusu GST değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna, KB + Su grubuna ve KB + Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir yükselme belirlendi. Yine KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur.

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada GST değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

GST'ler glutatyon'un (GSH) konjugasyonundan sorumlu fonksiyonel enzimler olarak bilinirler. Bu enzim elektrofilik substratlarla glutatyon'un konjugasyonunu katalizleyen detoksifiye edici izoenzimlerdir (Hayes ve Strange, 1995). GST, ksenobiyotik ve karsinojenlere karşı hücrel savunmada yer alır (Mantle ve ark., 1990; Mannervik ve ark., 1992; Hayes ve Pulford, 1995). Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyondaki (GSH) sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Oluşan bu GSH konjugatları organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar (Akkus, 1995). GST aktivitesindeki artışı oksidatif stres durumuna karşı koyma mekanizmasında izlenen adaptasyon olarak düşünülebilir. (Agrawal ve ark., 1991; Banerjee ve ark., 1999). Eritrosit, dalak ve karaciğerde anlamlı, kalpte anlamlı olmamakla birlikte keçiboynuzu + alkol grubunun, alkol grubundaki GST artışına karşın azalış göstermesi keçiboynuzu çekirdeğinin detoksifikasyona katkısı olabileceği varsayımına destek olabilir.

Keçiboynuzu çekirdeğinin beyin, böbrek, dalak, eritrosit, kalp ve karaciğer dokularındaki süperoksit dismutaz (SOD) sonuçları çizelge 4.7'de sunuldu. Çizelgede görüleceği gibi keçiboynuzu çekirdeğinin etil alkole karşı antioksidan özelliğinin çeşitli dokularda farklı etkilere neden oldukları gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre, dalak dokusu SOD değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma bulundu.

Eritrosit dokusu SOD değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görüldü. Yine KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş bulunmuştur.

Kalp dokusu SOD değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış belirlendi. Ayrıca KB + Alkol

grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş bulunmuştur.

Karaciğer dokusu SOD değerlerinde Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış görüldü. Bununla birlikte KB + Alkol grubunda Kontrol grubuna ve KB + Su grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş bulunurken, Alkol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artma bulunmuştur.

Diğer uygulama grupları arasındaki karşılaştırmada SOD değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunma enzimatik bir yol oluşturmuştur. Bu yolun ilk savunmasını SOD oluşturur. SOD aktivitesiyle açığa çıkan hidrojen peroksiti suya indirgeyen GPx ve KAT ikinci savunmayı kurarlar. Bu nedenle SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, ikinci kademe enzimlerinin aktivitesinde artış gerektirir. Yüksek süperoksit üretimine adaptasyonu gösteren SOD artışı ile GPx arasındaki dengesizlik, hücrelerdeki oksidatif strese işaret eder. Bir başka ifadeyle SOD/GPx oranındaki yükselme oksidatif hasarı ve patolojik olayları başlatabilir (Gaeta ve ark., 2002). Bu literatür ışığında, yapılan çalışmada Şekil 4.5 ile Şekil 4.7 birlikte değerlendirilecek olursa grup ve dokular eşleştirildiğinde SOD/GPx oranının azaldığı görülmektedir. Süperoksit üretimine karşı SOD enziminde azalma, oluşan hidrojen peroksitine karşı GPx'te artma olduğu ve antioksidan savunma sisteminin işlediği görülmektedir. Örnek verilecek olursa karaciğer Alkol grubundaki SOD'da anlamlı azalmaya karşın GPx'de anlamlı artış olduğu görülebilir. Ayrıca alkol gruplarındaki SOD baskılanmasına karşı keçiyoynuzu + alkol grubundaki SOD aktivitesinin artması keçiyoynuzu çekirdeğinin antioksidan savunma sistemine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; elde edilen biyokimyasal verilerin doğrultusunda etil alkolün sıçan karaciğerlerinde meydana getirmiş olduğu tahribata bağlı olarak karaciğer harabiyet göstergesi olan serum enzimlerinin seviyelerinde artışa neden olmuştur. Keçiyoynuzu çekirdeğinin karaciğer harabiyet göstergesi olan bu serum enzimlerini kontrollere yakın değere çektiği görülmüştür. Ayrıca bu etkinin çekirdek içerikli yemlerle beslenen sıçanlarda karaciğer harabiyet göstergesi olan bu serum enzim seviyelerini azalttığı görülmektedir. Etil alkolün sebep olduğu oksidatif stres sonucu

oluşan serbest radikal üretiminin göstergesi olarak lipid peroksidasyonun son ürünü malondialdehit tüm dokularda artarken, birçok dokuda antioksidan savunma sistemi biyobelirteçlerinde dalgalanmalara sebep olmuştur. Keçiboynuzu çekirdeği etil alkolün neden olduğu bu oksidatif stres sonucu olarak tüm dokularda artan malondialdehiti kontrol değerlerine çektiği ve yine çeşitli dokularda dalgalanan antioksidan savunma sistemi biyobelirteçlerinde de etil alkol grubuna göre iyileştirme sağladığı tespit edilmiştir. Keçiboynuzu çekirdeğinin bu etkileri kesin söylenememekle birlikte keçiboynuzu çekirdeğinin içerdiği polifenollerin etken maddelerinin karaciğer koruyucu ve antioksidan rolü sayesinde bu tarz etkiler göstermiş olabileceği kanaatine varıldı. Diğer yandan, alkol ve keçiboynuzu çekirdeğini içeren yemlerle beslenen sıçanların dokularında antioksidan savunma sistemleri ve lipid peroksidasyon seviyelerinde görülen farklı düzeyde etkiler olmasının nedeni ise; dokuların hücresel fizyolojik adaptasyonun dokulara göre farklı nitelikte olmasından kaynaklanabilir. Ancak ilgili çalışmada, daha önce literatür taramalarında bu uygulama tarzında bir bilgiye rastlanmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Bu çalışmada, farklı dokular üzerinde farklı etkiler gösteren keçiboynuzu çekirdeğinin, deney hayvanları üzerinde yapılacak *in vivo* denemelere ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nifkar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and Oxidative Stres: A Review. *Med Sci Monit.* **10**: 141-147.
- Addis, P., B., 1986. Occurrence of Lipid Oxidation Products in Foods. *Food Chem Toxicol.* **24**: 1021-1030.
- Agrawal, D., sultana, P., Gupta, G., S., D., 1991. oxidative damage and changes in glutathione redox system in erythroctes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Fd. Chem. Toxicol.*, **29**: 459-462.
- Akkuş, İ., 1995. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım A.Ş., Yay. No: 38, Konya. 32-41.
- Al-Abrash, A., S., Al-Quobaili, F., A., Al-Akhras, G., N., 2000. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stres. *Saudi Med. J.*, **21**: 826-830.
- Aleynik, I., S., Leo, A., M., Ma, Y., Aleynik, K., M., Lieber, S., C., 1997. Polyenylphosphatidylcholine Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Lipid Peroxidation While it Attenuates Liver Fibrosis. *J.Hepatol.*, **27**: 554-561.
- Ames, B., N., 1986. Food Constituents as A Source of Mutagens, Carcinogens and Anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res.* **206**: 3- 32.
- Ames, B., N., Shigenaga, M., K., Hagen, T., M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci.*, **90** (17): 7915-7922.
- Anonim, 2011a. Prof. Saraçoğlu Phytotherapy Bitkiler: Keçiboynuzu Bilgi. <http://www.saracoglu.at/bolum.php?name=bitkiler&hid=keciboynuzu> Erişim tarihi: 22.04.2011.
- Anonim, 2011b. INCOM A.Ş Keçiboynuzu zamkı. http://www.incomas.com/1c-keciboynuzu_zamki.aspx Erişim tairihi: 21.03.2011.
- Aruoma, O., I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *American Oil Chemists Society*, **75**: 199-212.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., Monzani, A., 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Compos. Anal.*, **10**: 166-172.

- Ayaz, F., A., Torun H., Glew, R., H., Bak, Z., D., Chuang, L., T., Presley, J., M., Andrews, R., 2009. Nutrient Content of Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) Flour Prepared Commercially and Domestically. *Plant Foods Hum Nutr.*, **64**: 286–292.
- Aycicek, A., Erel, O., Kocyigit, A., 2005. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr*, **164**: 775-778.
- Aydın, S., A., Üstün, F., 2007. Tanenler 1: kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **33** (1): 21-31.
- Babior, B., M., 2000. Phagocytes and Oxidative Stres. *Am J. Med.* **109**: 33-34.
- Banerjee, B., D., Seth, V., Bhattachary, A., Pahsa, S., T., Chakraborty, A., K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, **107**: 33-47.
- Barber, R., D., Donohue, T., J., 1998. Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. *J. Mol. Biol.*, **280**: 775-784.
- Barracosa, P., Osorio, J., Cravador, A., 2007. Evaluation of fruit and seed diversity and haracterization of carob (*Ceratonia siliqua* L) cultivars in Algarve region. *Sci. Hortic*, **114**: 250–257.
- Bast, A., Haenen, M., Cees, J. and Doelwan, A., 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art. *The American Journal of Medicine.* **91**: 2-10.
- Beckman, J., S., and Koppenol, W., H., 1996. Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, The Bad, and Ugly. *Am J. Physiol.* **271**: 1424-1437.
- Beyer, R., E., 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol.* **70**: 390-403
- Bianchi, G., Solaroli, E., Zaccheroni, V., Grossi, G., Bargossi, A., M., Melchionda, N., Marchesini, G., 1999. Oxidative Stress and Anti-oxidant Metabolites in Patients with Hyperthyroidism: Effect of Treatment. *Horm Metab Res*, **3** (11): 62-124.
- Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., Pekmezci, M., 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chem.*, **100**: 1453–1455.
- Birnboim, H., C., Kanabus-Kaminska, M., 1985. The Production of DNA Strand Breaks in Human Leukocytes by Superoxide Anion May Involve a Metabolic Process. *Proc. Acad. Sci.*, **82**: 6820-6824.

- Bondy, S., C., and Naderi, S., 1994. Contribution of Hepatic Cytochrome P450 Systems to The Generation of Reactive Oxygen Species. *Biochem Pharmacol.* **48**: 155-159.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**: 617–630.
- Bresolin, T., M., B., Milas, M., Rinaudo, M., Reicher, F., Ganter, J., L., M., S., 1999. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**: 225-231.
- Brigelius-Fhole, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidase. *Free. Radic. Biol. Med.*, **27**: 951-965.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, **61** (5): 882-888.
- Büyükbaş, S., İnal, A., 2006. İlimli alkol alan erkeklerde laktat dehidrogenaz izoenzim değişiklikleri. *Van Tıp Dergisi*, **13** (3): 85-89.
- Calixto, F., S., Cañellas, J., 1982. Components of nutritional interest in carob pods (Ceratonia siliqua). *J. Sci. Food Agric.*, **33**: 1319-1323.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, **113**: 484-490.
- Chung, K., T., Wong, T., Y., Wei, C., I., Huang, Y., W., Lin, Y., 1998. Tanens and human Health: a Review in Crit. *Rev. Food Sci. Nutr.*, **38** (6): 421-464.
- Coppen, J., J., W., 1995. *Gums, resins and latexes of plant origin*. Rome: FAO, Yay. no: 6, Rome, Italy. 142.
- Cowie, M.R., 2002. Coronary Risk-Time For a More Sophisticated Approach, *Eur. Heart J.*, **23**: 589-591.
- Dal-Pizzol, F., Ritter, C., Klamt, F., Andrades, M., da Frota, M., L., Jr., Diel, C., de Lima, C., Braga Filho, A., Schwartzmann, G., Moreira, J., C., 2003. Modulation of Oxidative Stress in Response to Gamma-Radiation in Human Glioma Cell Lines. *J. Neurooncol.* **61**: 89-94.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, **57**: 779-795.

- Demple, B., 1990. Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Progress in Clinical & Biological Research*, 340, 155-167.
- Diplock, A.T., 1991. Antioxidant Nutrients and Disease Prevention: An Overview. *Am. J. Chim Nutr*, **53**: 1895-1935.
- Dizdaroğlu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E., 1991. Damage to the DNA Bases in Mammalian Chromatin by Hydrogen Peroxide in the Presence of Ferric and Cupric Ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**: 317-324.
- Dröge, W., 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82**: 47–95.
- Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A., 1993. Free radicals and antioxidant systems. *Mater Med Pol.*, **25** (1): 37-43.
- Esselty, C., B., 2000. In cholesterol lowering, moderation kills. *Cleve Clin. J. Med.*, **67** (8): 560-564.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Maeda, H., 2002a. Tumor-targeted Delivery of Polyethylene Glycol-conjugated D-amino Acid Oxidase for Antitumor Therapy via Enzymatic Generation of Hydrogen Peroxide. *Cancer Res.* **62**: 3138-3143.
- Fang, Y., Z., Yang, S., Wu, G., 2002b. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition.* **18**: 872-879.
- Fleming, I., ve Buse, R., 2001. Vascular Cytochrome P450 in The Regulation of Renal Function and Vascular Tone: EDHF, Superoxide Anions and Blood Pressure. *Nephrol Dial Transplant.* **16**: 1309-1311.
- Flohe, L., Ötting, F., 1984. SOD assays. *Methods in Enzymology*, **105**: 93-101.
- Freeman, B., A., Crapo, J., D., 1982. Biology of disease. free radicals and tissue injury. *Lab Invest.*, **47** (5): 412-426.
- Feredioon, S., Janitha, P., K., Wanasundara, P., D., 1992. Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32** (1): 67-103.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* **44**: 147-159.
- Gaeta, L., M., Tozzi, G., Pastore, A., Federici, G., Piemonte, F., 2002. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subject. *Clinica Chimica Acta*, **322** (1): 117-120.
- Ghio, A., J., Devlin, R., B., 2001. Inflammatory Lung Injury After Bronchial Instillation of Air Pollution Particles. *Am. J Respir Crit Care Med.* **164**: 704-708.

- Gilbert, D., L., Colton, C., A., 1999. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter Disciplinary Approach*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Goburdhun, D., and Jhurree, B., 1995. Effect of Deep-Fat Frying on Fat Oxidation in Soybean Oil. *Int. J Food Sci Nutr.* **46**: 363-371.
- Goepfar, A., R., Te Koppele, J., M., Neve, E., P., Vermeulen, N., P., 1992. Reductase and Oxidase Activity of Rat Liver Cytochrome P450 with 2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone as Substrate. *Chem Biol Interact.* **83**: 249-269.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V., 1999. Resistance Factors to Grey Mould in Grape Berries: Identification of Some Phenolics Inhibitors of Botrytis cinerea Stilbene Oxidase. *Phytochemistry*, **52**: 759–767.
- Gross, E., Sevier, C.S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C.A., Thorpe, C., Fass, D., 2006. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 299–304.
- Gutteridge, J., M., C., Rowley, D., A., Halliwell, B., 1981. Superoxide-dependent Formation of Hydroxyl Radical in the Presence of Iron Salts: Detection of Free Iron in Biological System by Bleomycin-dependent Geradation of DNA. *Biochem. J.*, **199**: 263-265.
- Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1981. Assays for differentiation of glutathione-s-transferase. *Medhods Enzymol.*, **77**: 398-405.
- Halliwell, B., 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto*, **73**: 1075-1086.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen Radicals: Commonsense Look at Their Nature and Medical Importance. *Medical Biology*. **62**: 71-77.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., M., C., Aruoma, O., I., 1987. The Deoxyribose Method: A Simple test-tube Assay for Determation Ofrate Constant of hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry*, **165**: 215-219.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence?, *Lancet*, **344**: 721-724.

- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization : Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **49** (10): 1341-1348.
- Halliwell, B., Murcia, M., A., Chirico, S., Aruoma, O., I., 1995. Free Radical and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **35**: 7-20.
- Halliwell, B., ve Gutteridge, J., M., C., 1999. Free Radical in Biology and *Medicine*. *Oxford Science Publication*. Oxford, NY
- Hayes, J., D., and Pulford, D., J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *CRC Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.*, **30**: 445-600.
- Hayes, J., D., and Strange, R., C., 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad Res Commun*, **22**: 193-207.
- Hollingworth, R., M., Dong, K., 2008. *The Biochemical and Molecular Genetic Basis of Resistance to Pesticides in Arthropods: Global Pesticide Resistance in Arthropods*, Cromwell, UK. 40-90.
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**: 145-169.
- Ishii, H., Kurose, I., Kato, S., 1997. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol.*, **12**: 272-282.
- Jain, K., Kataria, S., Guruprasad, K., N., 2004. Oxradicals Under UV-B Stress and Their Quenching by Antioxidants. *Indian J Exp Biol*. **42**: 884-892.
- Jurkiewicz, B., A., Buettner, G., R., 1994. Ultraviolet Light-Induced Free Radical Formation in Skin: An Electron Paramagnetic Resonance Study. *Photochem Photobiol*. **59**: 1-4.
- Kanofsky, J., R., 1989. Singlet Oxygen: Production by Biological Systems. *Chemico-Biological Interactions*, **70**: 1-28.
- Karayılanoğlu, T., Demirci, D., Karayılanoğlu, V., 1991. Kronik alkoliklerde bazı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi. *Biyokimya Derg.*, **3**: 51-56.

- Karihtala, P., Soini, Y., 2007. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Mechanisms in Human Tissues and Their Relation to Malignancies. *APMIS*, **115**: 81-103.
- Karkacıer, M., Artık, N., 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua L.*) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *Gıda*, **20** (3): 131-136.
- Kavas, G., 1989. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri*, **1** (9): 1-8.
- Kayalı, R., Çakatay, U., 2004. Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları, Cerrahpaşa J Med, **35** (2): 83-89.
- Kelly, F., J., 2003. Oxidative Stress: Its Role in Air Pollution and Adverse Health Effects. *Occup Environ. Med.* **60**: 612-616.
- Kelly, F., J., Sandstrom, T., 2004. Air Pollution, Oxidative Stres and Allergic Response. *Lancet.* **363**: 95-96.
- Kılınç, K., 1985. Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi*, **10**: 60-89.
- Kılınç, K., 1995. Oksijen Radikalleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Klinik Gelişim*, **8**: 3850-3868.
- Kim, J., G., Yousef, A., E., Khadre, M., A., 2003. Ozone and İts Current and Future Application in The Food İndustry. *Adv Food Nutr Res.* **45**: 167-218.
- Klenow, S., Jahns, F., Pool-Zobel, B., L., Glei, M., 2009. Does an extract of carob (*Ceratonia Siliqua L.*) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 2999–3004.
- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B., 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem.*, **78**: 213–217.
- Kono, S., Ikeda, M., Tokudome, S., Kuratsume, M., 1988. A case-control study of gastric cancer and diet in northern kyushu, Japan. *Jap. J. Cancer Res.*, **79**: 1067-1074.
- Kovacic, P., Jacintho, J., D., 2001. Mechanisms of Carcinogenesis: Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem.* **8**: 773–796.

- Krahenbuhl, S., Talos, C., Lauterburg, B., H., Reichen, J., 1995. Reduced Antioxidative Capacity in Liver Mitochondria From Bile Duct Ligated Rats. *Hepatology*, **22**: 607-612.
- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* **59**: 612–619.
- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M., Nakayama, T., 2002. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 373–377.
- Kuppusamy, U., Das, N., P., 1993. Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacol Toxicol.*, **72**: 290-295.
- Levine, S., A., Kidd P., M., 1986. *Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology. Biocurrents Division*. Allergy Research Group, San Leandro, California. 376.
- Lindi, C., Montorfano, G., Marciani, P., 1998. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. *Alcohol*, **16**: 311-316.
- Lu, Y., Foo, Y., L., 2001. Antioxidant Activities of Polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**: 197-202.
- Lyng, F., M., Seymour, C., B., Mothersill, C., 2001. Oxidative Stress in Cells Exposed to Low Levels of Ionizing Radiation. *Biochem Soc Trans*, **29**: 350-353.
- Makris, D., P., Kefalas, P., 2004. Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Technol Biotechnol*, **42**: 105–108.
- Mannervik, B., Awashi, Y., Board, P., Hayes, J., Dilio, C., Ketterer, B., 1992. Nomenclature for human glutathione S transferase. *Biochem J.*, **282**: 305-308.
- Mantle, T., McCusker, F., Phillips, M., Boyer, S., 1990. Glutathione S-transferases. *Isoenzymes*, **18**: 175-177.
- Marakis, S., 1996. Carob bean in food and feed: current status and future potentials - a critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.*, **33**: 365-383.
- Mari, M., Cederbaum, A., I., 2001. Induction of catalase, alpha and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology*, **33**: 652-661.

- Marklund, S., L., 1990. Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods in Enzymology*, **186**: 260-265.
- Matés, J., M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, **32** (8): 595-603
- Matés, J., M., 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in The Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*. **153**: 83–104.
- Maxwell, S., R., J., 1995. Prospect for use of antioxidant therapies. *Drugs*, **49** (3): 345-361
- McCord, J., M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol Chem.*, **244**: 6049-6055.
- McCord, J., M., 1985. Mechanism of disease. *The New England Journal of Medicine*, **312**: 159-163.
- McCord, J., M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant antioxidant balance, *Clinical Biochemistry*. **26**: 357-651.
- McCord, J., M., 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stres. *Am J Med*. **108**: 652-659.
- McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., Harrison, D.G., 2003. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol*. **285**: H2290–H2297.
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science*, **220**: 472-477.
- Meister, A., 1995. Glutathione Metabolism. *Methods Enzymol*, **251**: 3-7.
- Menzel, D., B., 1994. The Toxicity of Air Pollution in Experimental Animals and Humans: The Role of Oxidative Stres. *Toxicol Lett*. **72**: 269-277.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.*, **15**: 91-96.
- Miquel, J., Ramirez-Bosca, A., Ramirez-Bosca, J., V., Alperi, J., D., 2006. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*, **42** (3): 289-306.

- Misso, N., L., Brooks-Wildhaber, J., Ray, S., Vally, H., Thompson, P., J., 2005. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J*, **26**: 257-264.
- Morton, J., F., 1987. Carob, 10. *Fruits of Warm Climates*. (Julia F. Morton) Miami, FL. 65-69.
- Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H., Kasai, H., 1997. Glyoxal, a major product of DNA oxidation, induces mutations at G:C sites on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, **25**: 1897-1902.
- Murray, R., K., Granner, D., K., Mayes, P., A., Rodwell, V., W., Harper's Biochemistry. 1988: 21th Edition. Appleton & Lange. Norwalk. Connecticut/San Mateo. California. IX-700. ISBN 0-8385-3648-4
- Nair, V., Cooper, C., S., Vietti, D., Turner, G., A., 1986. The Chemistry of Lipid Peroxidation Metabolites: Crosslinking Reactions of Malondialdehyde. *Lipids*, **21** (1): 6-10.
- Nakano, A., Koyama, I., Matsunaga, T., Nakajima, T., Hirose, H., Sato, M., Komoda, T., 1999. Expression of reactive oxygen-related enzymes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured with high concentrations of glucose. *Rinsho Byori*, **7**: 676-681.
- Nishimura, M., and Teschke, R., 1982. Effect of chronic alcohol consumption on the activities of liver plasma membrane enzymes: Gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase and 5' nucleotidase. *Biochem Pharmacol*, **31** (3): 377-381.
- Niwa, Y., Ishimoto, K., Kanoh, T., 1990. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood*, **76**: 835-841.
- Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A., Staniek, K., 2003. Are Mitochondria a Spontaneous and Permanent Source of Reactive Oxygen Species? *Redox Rep*. **8**: 135-141.
- Nordmann, R., Ribière, C., Rouach, H., 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol induced cellular injury. *Free Rad Biol Med*, **12**: 219-240.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H., R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R., 2004. Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSⁿ. *Agric. Food Chem.*, **52**: 3784-3791.

- O'Donnell, V.B., Azzi, A., 1996. High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme. *Biochem. J.* **318**: 805–812.
- Oldfield, J., E., 1987. The two faces of selenium. *J. Nutrition*, **117**: 2002-2008.
- Ono, M., Sekiya, C., Ohhira, M., Namıkı, M., Endo, Y., Suzuki, K., Matsuda, Y. and Taniguchi N., 1991. Elevated level of serum Mn-SOD in patients with primary biliary cirrhosis: possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **118** (5): 477-483.
- Özmen, D., Ersöz, B., Bayındar, O., Menteş, G., Erlaçın, S. 1988. Alkolizm ve alkolik karaciğer sirosunda gamma-glutamil transpeptidazın değeri. *Ege Üniv. Tıp Fak. Derg.*, **27** (3): 821-825.
- Paglia, D., E., Valentine, W., N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.*, **70** (1): 158-169.
- Poli, G., 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.*, **21**: 49-98.
- Pryor, W., A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetime, and recations. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**: 657-667.
- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R., A., Parks, D., A., 1992. Inhibition of Xanthine Oxidase by Uric Acid and Its Influence on Superoxide Radical Production. *Biochem Biophys Acta.* **1122**: 178-182.
- Radox Lab. Ltd., 1996. Ransod süperoxide dismutase enzim kiti, Ransel glutathione peroxidase enzim kiti.
- Ratnoff, O., D., Crum, J., D., 1964. Activation of hageman factor by solution of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, **63**: 359-377.
- Rice-Evans, C., A., Diplock, A., T., Symons, M., C., R., 1991. Investigation of the Consequences of Free Radical Attack on Lipids, 5. vol. 22. *Techniques in Free Radicals Research*. Elsevier, Amsterdam.
- Rice-Evans, C., A., Burdon, R., H., 1994. Free radical damage and its control: new comprehensive biochemistry. Elsevier Science B.V, Amsterdam, The Netherlands. Volume 28.

- Rice-Evans, C., A., Miller, N., J., Bolwell, P., G., Bramley, P., M., Pridham, J., B., 1995. The Relative Antioxidant Activities of Plant-derived Polyphenol Flavonoids. *Free Radical Research*, **22**, (4): 375-383.
- Riemarsma, R., A., Wood, D., A., Elton, R., A., Oliver, M., F., 1991, Risk of Angina Pectoris and Plasma Concentration of Vitamin A, C, E, and Caroten, *The Lancet*, **337**: 1-5.
- Riley, P., A., 1994. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and The Effects of Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat Biol.* **65**: 27-33
- Rizzi, R., Caroli, A., Bolla, P., Acciaioli, A., Pagnacco, G., 1988. Variability of reduced glutathione levels in massese ewes and its effect on daily milk production. *J. Dairy Research*, **55**: 345-353.
- Rothschild, M., A., Oratz, M., Schreiber, S., S., 1988. Serum albumin. *Hepatology*, **8**: 385-401.
- Roy, P., Roy, S., K., Mitra, A., Kulkarni, A.P., 1994. Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of NADH and NADPH. *Biochim. Biophys. Acta.* **1214**: 171-179.
- Sakai, H., Okamoto, T., Yamamoto, R., Sindhu, R., K., Kikkawa, Y., 1992. Suppressive Effect of Interleukin-1 on Pulmonary Cytochrome P450 and Superoxide Anion Production. *Biochem Biophys Res Commun.* **185**: 1083-1090.
- Sankarapandi, S., Zweier, J., L., 1999. Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper, zinc-SOD and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem*, **274** (49): 34576-34583.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannin. *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883.
- Schumann, K., 2001. Safety Aspects of Iron in Food. *Ann Nutr Metab.* **45**: 91-101.
- Seçmen, Ö., 1974. *Ceratonia siliqua* L'nın Ekolojisi. *Bitki*, **1** (4): 533-543.
- Sinclair, A., J., Barnet, A., H., Lunec, J., 1990. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med.*, **43**: 334-344.
- Singleton, P., Sainsbury, D., 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 3. John Wiley & Sons Ltd., England. 712.
- Skrede, S., Blomhoff, J., P., Elgjo, K., Gjone, E., 1973. Biochemical tests in evaluation of liver function. *Scand J. Gastroenterol*, **19**: 37-46.

- Slater, T.F., 1984. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **105**: 283-305.
- Sohol, R.S., 1993. The Free Radical Hypothesis of Aging. An Appraisal of The Current Status. *Aging*, **5**:3-17.
- Sonde, V., D'souza, A., Tarapore, R., Pereira, L., Khare, M.P., Sinkar, P., Krishnan, S., Rao, C.V., 2000. Simultaneous administration of diethylphthalate and ethyl alcohol and its toxicity in male Sprague–Dawlwy rats. *Toxicology*, **147**: 23–31.
- Southorn, P., A., 1988. Free Radicals in Medicine. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin Proc.*, **63**: 381-389.
- Starkov, A.A., 2008. The Role Ofmitochondria in Reactive Oxygen Speciesmetabolism and Signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* **1147**: 37–52.
- Sun, Y., Oberley, L., W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, **34** (3): 497-500.
- Suschetet, M., 1975. Influence of tannic acid on the hepatic content of vitamin A in rats fed a vitamin A containing diet or a vitamin A deficient diet. *C. R. in Soc. Biol.*, **169**: 970-978.
- Sushil, J.K., Mcvie, R., Duett, J., Herbst, J.J., 1989. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, **38**: 1539-1543.
- Şahin, E., Gümüşlü, s., 2004. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress model. *Behav. Brain Res.*, **155** (2): 241-248.
- Tachon, P., 1995. Ferric and Cupric Ions Requirement for DNA Single-stranded Breakage by H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*, **25**: 228-237.
- Takahama, U., Oniki, T., 1997. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*, **101**: 845-852.
- Tamagno, E., Aragno, M., Boccuzzi, G., Gallo, M., Parola, S., Fubini, B., Poli, G., Danni, O., 1998. Oxygen Free Radical Scavenger Properties of Dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem. Funct.* **16**: 57–63.
- Teschke, R., Krukenberg, S., Stremmel, W., and Nishimura, M., 1987. Enhanced biliary gamma-glutamyltransferase excretion following prolonged alcohol consumption in rats. *Eur. J. Clin. Invest.*, **17**: 347-353.

- Thornhill, M., H., 1993. The Sun, The Ozone Layer and The Skin: The Role of Ultraviolet Light on Lip and Skin Cancer. *Dent Update*. **20**: 236-240
- Tulard, A., Hoffschir, F., de Boisferon, F., H., Luccioni, C., Bravard, A., 2003. Persistent Oxidative Stress After Ionizing Radiation is Involved in Inherited Radiosensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 68-77
- Tunalioglu, R., Özkaya, M., T., 2003. Keçiboynuzu. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Bakış Dergisi*, **3** (5): 1-4.
- Turhan, İ., Tetik, N., Karhan, M., 2007. Keçiboynuzu pekmezinin bileşimi ve üretim aşamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 39-44.
- Tyulina, O., V., Prokopieva, V., D., Dodd, R., D., Hawkins, J., R., Clay, S., W., Wilson, D., O., Boldyrev, A., A., Johnson, P., 2002. In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes. *Alcohol*, **37**: 179-186.
- Umemura, U., Yokota, K., 1997. Effectiveness of a healthy education class to increase fish intake evaluated by serum fatty acids compositions. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, **44** (12): 901-909.
- Urso, M., L., Clarkson, P., M., 2003. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol.*, **189**: 41-54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., T., D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**: 44-84.
- Van Zutphen, L., F., M., Baumans, V., Beynen, A., C., 2001. *Principles of Laboratory Animal Science*. Second Edition, Elsevier Science, Amsterdam. 428.
- Vince, P., 1999. Antioxidant Potential of Vitamin A and Carotenoids and Their Relevance to Heart Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**: 746-761.
- Von Sonntag C., 2006. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 505.
- Wang, G., Bates-Kenney, S., R., Tao, J., Q., Phelps, D., S., Floros, J., 2004. Differences in Biochemical Properties and in Biological Function Between Human SP-A1 and SP-A2 Variant and The Impact of Ozone-Induced Oxidation. *Biochemistry*. **43**: 4227-4239.

- Wei, H., Frenkel, K., 1991. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter- treated mouse skin. *Cancer Research*, **51**: 4443- 4449.
- Xia, E., Rao, G., Remmen, H.V., Heydari A.R., Richardson, A., 1994. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male fischer 344 rats are altered by food restriction. *J. Nutr.*, **125**: 195-201.
- Yazıcı, C., Köse, K., 2004. Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **13** (2): 56-65.
- Young, I., S., Woodside, J.,V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54**: 176-186.
- Yousif, A., and Alghzawi, H., M., 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chem.*, **69**: 283–287.
- Zhou, F., Q., 2001. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions. *Acta Pharmacol Sin.*, **5**: 385-392.
- Zitko, V., Rosik, J., 1962. Tanen-gelatin reaction in Lichte der Theorie de Reaktionen kleiner Molekule mit Makromolekulern. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **27**: 2058.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Antalya'da doğdu. İlk ve ortaokulu Antalya'da tamamladı. 2003 yılında Antalya Karatay Süper Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Kastamonu Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümüne girdi. 2005 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi'nin aynı bölümüne yatay geçiş yaptı ve 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.