

T. C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVŞANLARDA MISTLETOE LEKTİN-I'İN FARKLI  
DOZLARININ TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR- $\alpha$ , NİTRİK  
OKSİT, TOTAL ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN  
KAPASİTE DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Araş. Gör. Ahmet HARMANKAYA**  
**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Ayla ÖZCAN**

**2013/KARS**

T. C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVŞANLARDA MISTLETOE LEKTİN-İ'İN FARKLI  
DOZLARININ TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR- $\alpha$ , NİTRİK  
OKSİT, TOTAL ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN  
KAPASİTE DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Araş. Gör. Ahmet HARMANKAYA**  
**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Ayla ÖZCAN**

**Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje No: 2011/VF-41**

**2013/KARS**

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Araş. Gör. Ahmet HARMANKAYA tarafından hazırlanmış olan **Tavşanlarda Mistletoe Lektin-I'in Farklı Dozlarının Nitrik Oksit, Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ , Total Oksidan ve Antioksidan Kapasite Düzeylerine Etkisi** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek *04. birliği* ile *... kabul ...* edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: *26.11.2013*

Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL

Üye : Prof. Dr. Ayla ÖZCAN

Üye: Prof. Dr. Necati UTLU

Üye: Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN

Üye: Doç. Dr. Emine ATAKİŞİ

Imza  
*[Handwritten signatures of Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL, Prof. Dr. Ayla ÖZCAN, Prof. Dr. Necati UTLU, Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN, and Doç. Dr. Emine ATAKİŞİ]*

Bu tezin kabulü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL

Enstitü Müdürü

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa No</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	I
<b>KISALTMALAR</b>	V
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b>	VIII
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	IX
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	X
<b>ÖNSÖZ</b>	XI
<b>1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER</b>	1
1. 1. Lektinler	1
1. 2. Ökse Otu (Mistletoe) Lektinleri	2
1. 2. 1. Mistletoe Lektin-I	3
1. 3. Serbest Radikaller	5
1. 3. 1. Serbest Radikal Kaynakları	7
1. 3. 1. 1. Endojen Kaynaklar	7
1. 3. 1. 2. Eksojen Kaynaklar	7
1. 3. 2. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri	7
1. 4. Nitrik Oksit	9
1. 4. 1. Nitrik Oksitin Sentezi	9
1. 4. 2. Nitrik Oksit Sentaz	10

1. 4. 2. 1. Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS II)	10
1. 4. 2. 2. Endotel NOS (eNOS, NOS III)	10
1. 4. 2. 3. Nöronal NOS (nNOS, NOS I)	11
1. 4. 3. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri	11
1. 4. 4. Nitrik Oksitin Organizmadaki Etkileri	12
1. 4. 5. Mistletoe Lektin-I ve Oksidan/Antioksidan Durum	13
1. 5. Sitokinler	15
1. 5. 1. Sitokinlerin Sınıflandırılması	17
1. 5. 1. 1. Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	18
1. 5. 2. Mistletoe Lektin-I ve TNF- $\alpha$ İlişkisi	20
<b>2. MATERYAL VE METOT</b>	<b>22</b>
<b>2. 1 Materyal</b>	<b>22</b>
2. 1. 1. Deney Gruplarının Oluşturulması	22
2. 1. 2. Kan Örneklerinin Alınması	23
<b>2. 2. Metot</b>	<b>23</b>
2. 2. 1. Analizler İçin Kullanılan Cihazlar	23
2. 2. 2. Analizler İçin Kullanılan Kimyasallar	24
2. 2. 3. TNF- $\alpha$ Analizi	24
2. 2. 3. 1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	24
2. 2. 3. 2. Mikroplakların Kaplanması	25

2. 2. 3. 3. Standart Eğrinin Hazırlanması	25
2. 2. 3. 4. Deneyin Yapılışı	26
2. 2. 4. Nitrik Oksit Analizi	27
2. 2. 4. 1. Deneyin Prensibi	27
2. 2. 4. 2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	28
2. 2. 4. 3. Standart Eğrinin Hazırlanması	29
2. 2. 4. 4. Numunelerin Deproteinize Edilmesi	29
2. 2. 4. 5. Nitrat Analizi	29
2. 2. 4. 6. Nitrit Analizi	31
2. 2. 4. 7. Sonuçların Hesaplanması	32
2. 2. 5. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi	32
2. 2. 5. 1. Deneyin Prensibi	32
2. 2. 5. 2. Kullanılan Reaktif ve Standartlar	32
2. 2. 5. 3. Deneyin Yapılışı	33
2. 2. 5. 4. Sonuçların Hesaplanması	34
2. 2. 6. Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi	34
2. 2. 6. 1. Deneyin Prensibi	34
2. 2. 6. 2. Kullanılan Reaktif ve Standartlar	34
2. 2. 6. 3. Deneyin Yapılışı	35
2. 2. 6. 4. Sonuçların Hesaplanması	36

2. 2. 7. İstatistiksel Analizler	37
<b>3. BULGULAR</b>	<b>38</b>
3. 1. Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Düzeyleri	40
3. 2. Nitrik Oksit (NO) Düzeyleri	41
3. 3. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Düzeyleri	43
3. 4. Total Oksidan Kapasite (TOK) Düzeyleri	44
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>45</b>
<b>5. ÖZET</b>	<b>52</b>
<b>6. SUMMARY</b>	<b>53</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>54</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>67</b>

**KISALTMALAR**

·OH: Hidroksil Radikali

7-NI: 7-Nitroindazol

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)

CAT: Katalaz

EDRF: Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

ELAM: Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

FAD: Flavin Adenin Dinükleotid

FMN: Flavin Mononükleotid

FRAP: Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç

GM-CSF: Granülosit Makrofaj Kolonisi Uyarıcı Faktör

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit

H<sub>4</sub>B: Tetrahidrobiopterin

HO<sub>2</sub>·: Hidroperoksi Radikali

HOCl: Hidrokloröz

ICAM: Hücre İçi Adezyon Molekülü



IFN- $\gamma$ : İnterferon- $\gamma$

IL: İnterlökin

iNOS: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz

LIF: Lösemi İnhibitör Faktör

L-NA: N-Nitro-L-Arjinin

L-NAME: N-Nitro-L-Arjinin Metil Esteri

L-NIO: İminoetil-L-Ornitin

L-NMMA: N-Monometil-L-Arjinin

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehit

MHC: Majör Histokompilite Kompleksi

ML-I: Mistletoe Lektin-I

NEDD: N-(1-naftil) Etilen Diamin Dihidroklorür

NF- $\kappa$ B: Doğal Faktör Kappa-B

NK: Naturel Killer (Doğal Öldürücü)

NMDA: N-Metil-D-Aspartat

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NO: Nitrik Oksit

NO<sub>2</sub>: Nitrojen Dioksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

$O_2^{\cdot-}$ : Süperoksit Anyonu

$ONOO^{\cdot-}$ : Peroksinitrit Radikali

PGE2: Prostaglandin E2

RIP: Ribozom İnaktive Edici Proteinler

$RO^{\cdot}$ : Alkoksil Radikali

$RO_2^{\cdot}$ : Alkil Peroksi Radikali

rRNA: Ribozomal RNA

SOD: Süper Oksit Dismutaz

TAK: Total Antioksidan Kapasite

TNF- $\alpha$ : Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$

TOK: Total Oksidan Kapasite

VAA-I: Viscum Album Aglutinin-I

VCAM: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü

**GRAFİKLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Grafik 1. TNF- $\alpha$ Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği	26
Grafik 2. Nitrat Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği	30
Grafik 3. Nitrit Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği	31
Grafik 4. ML-I Verilen Tavşanlarda Gruplar Arası TNF- $\alpha$ Değerleri	40
Grafik 5. ML-I Verilen Tavşanlarda Gruplar Arası NO Değerleri	41
Grafik 6. ML-I Verilen Tavşanlarda Grup İçi NO Değerleri	42
Grafik 7. ML-I Verilen Tavşanlarda Grup İçi TAK Değerleri	43
Grafik 8. ML-I Verilen Tavşanlarda Grup İçi TOK Değerleri	44

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1. Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri	13
Tablo 2. Sitokinlerin Sınıflandırılması	17
Tablo 3. TNF- $\alpha$ Analizi	27
Tablo 4. Nitrat Analizi	30
Tablo 5. Nitrit Analizi	31
Tablo 6. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi	33
Tablo 7. Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi	36
Tablo 8. ML-I Verilen Tavşanlarda TNF- $\alpha$ , NO, TAK ve TOK Düzeyleri	39

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1. ML-I'in A ve B Zinciri	4
Şekil 2. L-Arjininden Nitrik Oksit Sentezinin Basamakları	10

## ÖNSÖZ

Tibbi öneme sahip bitkiler eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, günümüzde üretilen yeni ilaçların yaklaşık % 50'sinde bitkilerden elde edilen fitokimyasallar kullanılmaktadır.

Meşe, kavak, elma ve akçaağaç gibi ağaçların üzerinde yarı parazitik yetişen ökse otu, eski çağlardan beri halk hekimliğinde hipertansiyon, epilepsi, ateroskleroz, gut, depresyon, uyku bozuklukları, baş ağrısı, boğmaca, astım, diyare gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır.

Günümüzde ökse otundan elde edilen ekstraktlar çeşitli ticari isimler (Isador, Helixor vb.) altında kanser tedavilerinde destekleyici olarak kullanılmaktadır. Bu ekstraktlardaki immünomodülatör ve sitotoksik etkilerden sorumlu maddelerin viskotoksinler ve özellikle de lektinler olduğu düşünülmektedir.

Lektinler, mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlarda bulunan monosakkarit ve oligosakkarit yapılara spesifik olarak bağlanabilen glikoproteinlerdir.

*Viscum album* (Ökse otu)'dan elde edilen lektinler, Mistletoe lektinleri (ML-I, ML-II ve ML-III) veya *Viscum Album Agglutininler* (VAA) olarak adlandırılmakta, birbirine disülfid bağlarıyla bağlı iki zincirden (A ve B) meydana gelmektedir. A zinciri mitojenik etki ve protein sentezini engelleme özelliğine sahipken, glikokonjugatlara bağlanan B zinciri, makrofaj aktive etme ve lenfosit salınımına neden olmaktadır.

ML-'in ribozomal düzeyde protein sentezini inhibe ettiği için sitotoksik, Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), İnterlökin1 (IL-1), IL-12 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırdığı ve granulositler, doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktive olmasını ya da çoğalmasını sağladığı için immünomodülatör etkisi bulunmaktadır.

Bu çalışmada sitotoksik ve immünomodülatör etkisinin olduğu bildirilen ML-l'in, farklı dozlarının tavşanlara intraperitoneal yolla verilmesiyle tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nitrik oksit (NO), total antioksidan ve oksidan kapasite (TAK, TOK) düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Doktora eğitimim boyunca bana büyük bir sabır gösteren, yardımlarını esirgemeyen ve yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Ayla ÖZCAN'a teşekkür borç bilirim. Varlıklarından manevi olarak güç aldığım ve benden yardımlarını esirgemeyen başta Prof. Dr. Şaban MARAŞLI olmak üzere, Doç. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN, Doç. Dr. Emine ATAKİŞİ, Yard. Doç. Dr. Metin ÖĞÜN ve Yard. Doç. Dr. OĞuz MERHAN'a, benden maddi ve manevi olarak hiçbir yardımı esirgemeyen, sık sık bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye, tez çalışmam esnasında bana yardımcı olan Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarım Muhsin ŞENER, Kezban DALGINLI, Rüya KAYA, Destan KALAÇAY, Büşra MERT, Yeşim AYDIN ve Canan GÜLMEZ'e teşekkür ediyorum.

Benimle beraber her türlü sıkıntıya göğüs geren hayat arkadaşım Sezen HARMANKAYA'ya ve benim yetişmem de çok büyük katkıları olan anneme ve babama ayrıca teşekkür ediyorum.

## 1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1. 1. Lektinler

Lektinler, doğada virüslerden bakterilere ve bitkilerden hayvanlara kadar pek çok kaynakta bulunabilen, spesifik olarak belirli monosakkaritleri ve oligosakkaritleri bağlayan, immün kaynaklı olmayan proteinlerdir (98, 118).

Terminal ve/veya subterminal karbonhidrat rezidülerine spesifite gösteren, en az iki tane şeker bağlama bölgesine sahip olan lektinler hücre yüzeyindeki karbonhidrat rezidülerini, sitoplazmik ve çekirdek yapılarını, hücre içi matriksin bileşenlerini tanır ve bağlanırlar (28, 101).

Lektinler, oligosakkarit zincirlerinin analizi, glikozilasyondaki değişmelerin belirlenmesi, glikokonjugatların miktarının ölçülmesi ve affinite pürifikasyonu ile sitoflorometrik hücre çalışmaları, hücre ayırması gibi histokimyada kullanılan önemli araçlardır (12,94). Bazı lektinler mitojenikken, bazıları sitotoksiktir veya sinir trafiğini ve patojen-konakçı etkileşimini kolaylaştırır. Bundan başka bitki lektinlerinin besinlerde yaygın olarak bulunmasından dolayı beslenmede önemli bir rol oynadığı kaydedilmiştir (12).

Bitkilerden elde edilen lektinlerin büyük bir kısmını oluşturan ribozom inaktive edici proteinlerin (RIP) en baskın üyesi olan risin, keneotu tohumundan elde edilen çok toksik ve hemaglutine edici bir proteindir. Risin'in yanı sıra ökseotundan elde edilen lektinler (Viscum album aglutinin veya mistletoe lektinleri) volkensin, modessin, abrin ve ebulin II de RIP lektin familyasının bilinen üyeleridir (116, 117).

Mistletoe lektinleri ve bu grubun diğer toksik lektinleri arasında yapılan X-ray ve amino asit dizileme çalışmalarında yapısal bir benzerlik



göstermelerine rağmen biyolojik aktiviteleri yönünden oldukça farklı oldukları gösterilmiştir (40).

Mistletoe lektin-I (ML-I)'in elde edildiği yarı parazit bir bitki olan ökse otu, eski çağlardan beri halk hekimliğinde hipertansiyon, epilepsi, ateroskleroz, gut, depresyon, uyku bozuklukları, baş ağrısı, boğmaca, astım, diyare gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış (18), günümüzde ise ökse otunun fermente-fermente olmayan sulu ekstraktlarının (Isador, Eurixor, Helixor vb.) çoğu ML-I içeriği yönünden standardize edilerek özellikle kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılmaktadır (27).

Ökse otunun bileşikleri üzerinde yetiştiği ağacın cinsine ve mevsimlere göre farklılık göstermekle birlikte (58), aktif bileşikleri viskotoksinler, alkaloidler, monoterpen glikozidler ve lektinler (ML-I, II ve III)'dir (54, 106). Yapılan araştırmalarda sitotoksik ve immünomodülatör etki yönünden en etkili bileşiğin RIP familyasına ait olan ML-I olduğu ileri sürülmüştür (90).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda ökse otu ekstraktlarının, önceden uyarılmış lökositlerden histamin salınımını inhibe etme (70), NK hücre ve granülositlerin fagositoz aktivitelerini artırma (64, 105), radyasyondan hasar görmüş monositlerin DNA'larının tamirine katkıda bulunma (65) gibi etkilerinin olduğu, bu etkilerin ökse otu ekstraktı içerisinde bulunan lektinler ve viskotoksinlerden kaynaklandığı bildirilmektedir (27).

## 1. 2. Ökse Otu (Mistletoe) Lektinleri

Ökseotunda mevsimsel faktörlere ve konakçı ağacın tipine göre farklı miktarlarda olmak üzere (15), ML-I, ML-II, ML-III diye adlandırılan, üç izolektin bulunmaktadır (40).

ML-I, II ve III diğer tip II RIP'ler gibi birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmış, toksoforik A zinciri ile karbonhidrat bağlayıcı B zincirinden meydana gelmekte (40), bulunduğu bitkiye has mannoz ve kompleks tip şeker yan zincirleri taşımaktadır (25). ML-I  $\beta$ -galaktozidlere, ML-III N-

asetilgalaktozidlere ML-II ise hem  $\beta$ -galaktozidlere hem de N-asetilgalaktozidlere bağlanmaktadır (40).

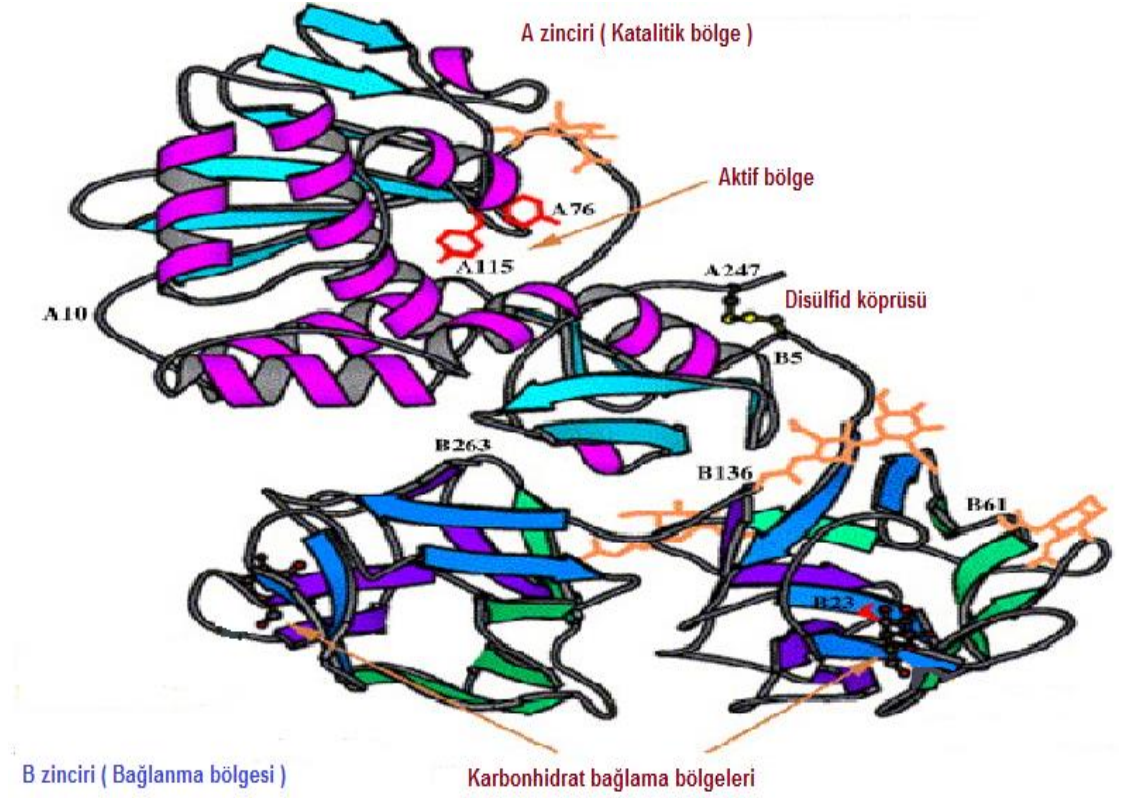
### 1. 2. 1. Mistletoe Lektin-I

Ökse otu ekstraktlarından elde edilen ML-I (39), *Viscum Album* Agglutinin I (VAA-I) (97) olarak da adlandırılmaktadır. Birbirine disülfid bağlarıyla bağlanmış A (254 amino asit) ve B (264 amino asit) zincirinden meydana gelmektedir (40, 103, 104, 117).

ML-I molekülleri negatif boyama tekniği ile uranil asetat veya uranil formiyatla lekelenerek, elektron mikroskopunda incelendiğinde, çubuk benzeri ve bunların yarısı kadar büyüklükte üçgen veya yuvarlak şekiller görülmüş, ML-I konsantrasyonundaki artış veya azalışın bu şekillerin sayısını değiştirdiği görülünce üçgen veya yuvarlak şekillerin ML-I'in monomer halini, çubuk benzeri şekillerin ise dimer halini gösterdiğine karar verilmiştir (71).

ML-I'in karbonhidrat kısmının, birisi altı mannoz ve 2-asetamido-2-deoksiglukoz ünitesi, diğeri beş mannoz ve 2-asetamido-2-deoksiglukoz ünitesinden oluşan iki tip glikandan meydana geldiği kaydedilmiştir (126).

Risin ve diğer tip-II RIP'lerdeki gibi B zincirinin (34 kDa) hücre yüzeyinde bulunan galaktoz içeren glikokonjugatlara bağlanarak A zincirinin (29 kDa) endositoz ile hücre sitozölüne geçip, 28S rRNA'nın 4324 pozisyonundaki adenozini uzaklaştırarak, ribozomun 60S büyük alt ünitesini inaktif hale getirdiği ve protein sentezini engellediği düşünülmektedir (41, 125).



**Şekil 1.** ML-I'in A ve B zinciri (56)

ML-I'in *in vitro* hücre kültür ortamında insan ve hayvan kanser hücreleri üzerinde mekanizması tam olarak aydınlatılmayan sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiş, bu konuda çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Lektinin B zincirinin hedef hücreye bağlanıp, A zincirinin protein sentezini inhibe etmesi, (17, 107), NK hücre, granülosit ve lenfosit aktivasyonu sağlama (17), hücrelerdeki golgi aygıtına hasar verme (126), reseptörden bağımsız olarak mitokondrilerden sitozole sitokrom c salınımını arttırma (5) ve telomeraz enzimini inhibe etme (72) ileri sürülen mekanizmalardan bazılarına örnek olarak verilebilir.

Hajto ve ark. (47), tavşanlara subkutan olarak 0,25-1 ng/kg aralığında ML-I verdiklerinde NK hücre aktivitesinde, granüler lenfositlerin sayısı ve fagositoz fonksiyonunda bir artış olduğunu saptamışlardır.

Hajto ve ark. (50) Wistar cinsi ratlara tek doz 0,5 ve 1 ng/kg konsantrasyonundaki ML-I intravenöz olarak vermiş ve 48 saat sonra, NK

hücrelerin sitotoksik aktivitelerinin iki katına, granüler lenfositlerin sayısının üç katına çıktığını görmüşlerdir.

Beuth ve ark. (7), deneysel olarak kanser oluşturdukları BALB/c farelere subkutanöz olarak 0,79 ng/kg dozunda ML-I verdiklerinde, karaciğer ve akciğerdeki tümör kolonilerinin sayısının azalışına paralel olarak, NK hücrelerin sitotoksik aktivitesinde, granüler lenfosit ve makrofaj sayısında bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

*In vitro* çalışmalarda ML-I'in monosit/makrofaj, granülosit ve NK gibi hücrelerden TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırdığı kaydedilmiştir (48, 49).

Az miktardaki ökseotu preparatının tehlikeli olmadığı yüksek dozlarının ise kusma, diyare, hipotansiyon, hepatit, koma hatta ölüme neden olabileceği, subkutan uygulamalarda ise titreme, ateş, baş ağrısı, boğaz yangısı, eozinofili ve anafilaktik reaksiyonların görülebileceği kaydedilmiştir (45, 99, 118).

İmmunomodülatör (53, 62, 64) ve sitotoksik (42, 92) etkilerinden dolayı özellikle kanser araştırma ve tedavi yöntemlerinde kullanılan (7) ML-I'in mikrogliya hücrelerinin, Alzheimer plağı glikoproteinlerinin seçici olarak boyanmasında da faydalı yöntemler olduğu ileri sürülmektedir (3, 100)

### **1. 3. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller, atom veya molekül orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, hem organik (119) hem de inorganik (109) moleküllerdir (115). Eşlenmemiş elektronlar serbest radikale önemli derecede reaktivite sağlar (115). Bir molekülün veya grubun, serbest radikal olduğunu göstermek için üst kısmına bir nokta konur. Serbest radikaller elektriksel yük olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler (26).

Hücrede normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan radikaller olduğu gibi, organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara ve doğal durumda serbest radikal metabolitleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler (34).

Bir bileşiğin bir elektron kaybetmesi, ilave bir elektron alması veya kovalent bağının homolitik olarak kırılması sonucu oluşabilen (26), serbest radikaller reaktif oksijen (ROT), nitrojen (RNT) ve klor (RKT) türleri olarak adlandırılmaktadır (37). Önemli reaktif oksijen türlerine süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\cdot OH$ ), alkoksil ( $RO\cdot$ ), alkil peroksi ( $RO_2\cdot$ ), hidroperoksi ( $HO_2\cdot$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2\cdot$ ), reaktif nitrojen türlerine nitrik oksit ( $NO\cdot$ ), nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO\cdot$ ), reaktif klor türlerine de hidrokloröz ( $HOCl$ ) örnek verilebilir (26, 30).

Vücudumuzda ve çevremizde sadece oksijenin değil, diğer atom merkezli radikaller de oluşabilse de özellikle biyolojik sistemlerde radikal kavramından bahsedildiğinde oksijen kaynaklı radikaller akla gelmektedir. Bu görüşün başlıca nedenleri şunlardır (60).

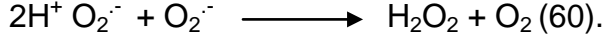
1- Diğer atom merkezli radikaller diffüzyon limitine yakın büyük bir hızla oksijenle tepkimeye girerek paylaşılmamış elektron oksijen atomu üzerine kayar ve böylelikle radikalik özellik oksijen atomu üzerinde devam eder.

2- Moleküler oksijen hücrelerde devamlı olarak kullanıldığı için elektron transferi ile spin kısıtlamasının aşılması gerekir. Bu nedenle de oksijen metabolizması esnasında radikal türlerinin oluşması kaçınılmazdır.

3- Elektrofilik bir atom olan oksijen dış orbitaline elektron alarak biyomolekülleri oksitler ve bu sırada kendisinin radikal türleri oluşur. Metal iyonları da oksijenin bu tür oksitleyici etkilerini artırır.

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitlerken, sitokrom c'yi indirger (32).  $O_2^{\cdot-}$ 'nin ortamdan bir elektron daha almasıyla peroksi anyonu ( $O_2^{-2}$ ), bunun da ortamdan iki proton almasıyla  $H_2O_2$  oluşur veya iki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'i

meydana getirir (60). Gerçekte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü serbest radikal olmamasına rağmen, ·OH oluşumuna yol açabileceğinden oksidan olarak kabul edilmektedir. Oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye bir elektron ve bir proton eklenmesi ile son derece reaktif olan ·OH oluşur (26).



### **1. 3. 1. Serbest Radikal Kaynakları**

#### **1. 3. 1. 1. Endojen Kaynaklar**

Mitokondriyal ve mikrozomal elektron zinciri, aktive olmuş fagositler (polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar), İskemi-reperfüzyon, araşidonik asit kaskadının aktivasyonu, katekolaminler ve monosakkaritler gibi moleküllerin otooksidasyonu ile sitokrom p450, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz'ın katalizlediği reaksiyonlar (26).

#### **1. 3. 1. 2. Eksojen Kaynaklar**

Aşırı oksijen konsantrasyonu, iyonize edici radyasyon, sigara ve ksenobiyotikler (paraquat ve doksorubin vb.) (26).

### **1. 3. 2. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri**

Dokularda meydana gelen serbest radikaller ve ROT'lar oksidatif atağa meyilli olan DNA, nükleik asitler, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli yapılara zarar vermektedir (115).

Serbest radikallerin oluşum hızları ile antioksidanların bunları etkisiz hale getirme hızı arasındaki denge ile hücreler oksidanların zararlı etkilerinden korunmaktadır. Ancak bu denge serbest radikaller lehine bozulursa

oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres durumunda DNA hasarı, lipid oksidasyonu, protein modifikasyonu ve hücre reseptörlerinin fonksiyonlarında değişimler meydana gelmektedir (23, 37).

İnflamasyon, yaşlanma, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, diyabet ve kanser gibi hastalıkların serbest radikallerle alakalı olduğu düşünülmektedir (22, 26, 61)

Zararlı etkilerine karşın organizma serbest radikalleri gen ekspresyonu, apoptozisin uyarılması, doku oluşumu ve farklılaşması ve enfeksiyonlarla mücadele (özellikle  $\text{NO}\cdot$  ve  $\text{O}_2\cdot^-$ ) gibi olaylarda kendi faydasına kullanabilmektedir (37).

Canlı hücrelerde protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denilmektedir (23). Serbest radikaller, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ve A, E ve C vitaminleri, glutatyon (GSH), ubikinon ve flavonoidler gibi enzim olmayan antioksidanlar ile etkisiz hale getirilmektedir (114).

Organizmanın sürekli olarak gerek endojen gerekse de eksojen kaynaklı serbest radikallere maruz kalması ve bunların çeşitli hastalıkların etiyolojisinde rol oynaması nedeniyle doku veya vücut sıvılarındaki oksidan/antioksidan dengesinin bilinmesi önem kazanmaktadır. Bu yüzden birçok oksidan ve antioksidan ölçüm yöntemleri tanımlanmıştır (35, 36, 57). Bu çalışmada Erel (35, 36) tarafından geliştirilen TOK ve TAK ölçüm yöntemleri kullanılmıştır.

#### 1. 4. Nitrik Oksit

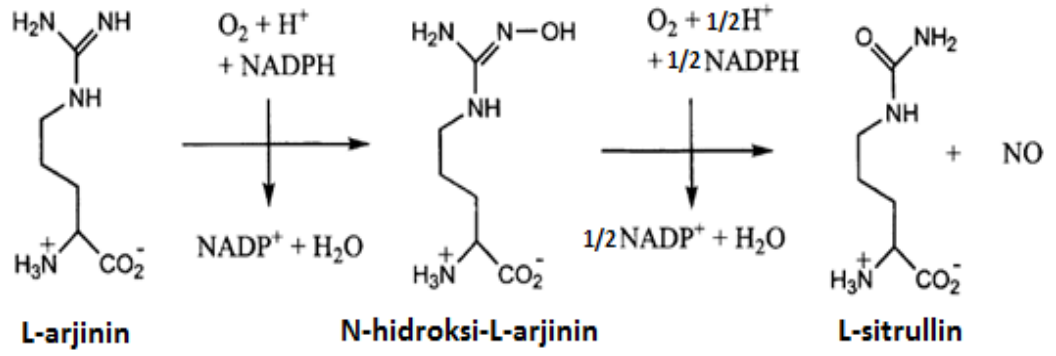
Nitrik oksit (NO), renksiz, suda ve yağda çözünebilen, yarılanma ömrü kısa, stabil bir gazdır (24). Üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurmaması hücre membranlarından kolaylıkla diffüze olmasını sağlamaktadır (69). Tiyol grupları ile reaksiyona girerek gerektiği zaman kullanılmak üzere depolanmaktadır (73).

Nitrik oksit, ilk kez 1972 yılında Josef Priestley'in yapmış olduğu bir takım deneyler esnasında tanımlanmış fakat *in vivo* olarak varlığı 1914 yılında Sir Henry Dale tarafından bildirilmiştir (33). Furchgott ve Zawadzki, 1980 yılında sağlam damar üzerine asetilkolin uyguladıkları zaman damar düz kaslarının gevşediğini, endotel tabakaya hasar verdiklerinde ise gevşeme yerine kasılmanın meydana geldiğini, buna endotelden kaynaklanan bir maddenin neden olduğunu gözlemlemiş ve endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF: Endothelyum-derived relaxing factor) adını vermişlerdir (14). Ancak 1987 yılında, damar endotelinden EDRF olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentaz (NOS) keşfedilmiş, daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir. NO üzerine olan çalışmaların artmasıyla hakkında çok az şey bilinen NO'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992 yılında, yılın molekülü seçilmiştir (113).

##### 1. 4. 1. Nitrik Oksitin Sentezi

Gerçek bir çekirdeğe sahip canlılarda NO, NOS'ın (EC: 1.14.13.39) L-arjinini okside edip L-sitrullin oluşturması esnasında sentezlenmektedir (92).





**Şekil 2.** L-Arjininden Nitrik Oksit Sentezinin Basamakları (14)

#### 1. 4. 2. Nitrik Oksit Sentaz

Memelilerin, damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem gibi farklı dokularından (111) entoteliyal (eNOS), nöronal (nNOS) ve uyarılabilir NOS (iNOS) olmak üzere üç farklı tip NOS izoformu izole edilmiştir (92).

##### 1. 4. 2. 1. Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS II)

Uyarılabilen NOS kalsiyumdan bağımsız, bazı sitokinler (IL-1, TNF, IF- $\gamma$ ) veya bakteriyel endotoksinlerle uyarılabilen (79, 82) ve ilk kez aktive olmuş makrofajlardan izole edilen bir enzimdir (80). Uyarılmasından sonra 4-24 saat aktif kalmakta ve nanomolar düzeyde (eNOS ve nNOS'un ürettiğinden 100 kat daha fazladır) NO üretmektedir (75).

##### 1. 4. 2. 2. Endotel NOS (eNOS, NOS III)

Vasküler endotel hücreleri, hipokampal sinir hücreleri, pulmoner ve renal epitel hücreleri ile kardiyak miyositlerde lokalize olan, eNOS 135 KDa ağırlığında,  $Ca^{+2}$ /kalmodulin bağımlı bir enzimdir (77). Hücre membranına

miristolat köprüsü vasıtasıyla N-terminal bölgesindeki glisin ile bağlanmaktadır (82).

Endotel kaynaklı NO'nun vasküler tonüsün sürdürülmesi, organlardaki kan akımının düzenlenmesi ve kandaki hücrelerin damar duvarına adezyonunun engellenmesi gibi görevleri vardır (93).

#### **1. 4. 2. 3. Nöronal NOS (nNOS, NOS I)**

Merkezi ve periferik sinir sistemindeki hücrelerde (29) ve çizgili kaslarda (81) bulunan,  $Ca^{+2}$  bağımlı, 166 kDa ağırlığında bir enzimdir. Sinir hücrelerinde  $Ca^{+2}$  nin hücreye girebilmesi için N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin uyarılması ve bu reseptörlerin bağlı olduğu katyon kanallarının açılması gerekmektedir (29).

Nöronal NOS'un ürettiği NO fizyolojik düzeydeyken sinir iletimi ve hafıza oluşumunda görev alır. NMDA reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan yüksek düzeydeki NO mikroglia hücrelerinin nörotoksisitesinde önemli bir rol oynar (42).

#### **1. 4. 3. Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri**

**L-arjinin analogları:** N-monometil L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin (L-NA), N-nitro-L-arjinin metil esteri (L-NAME) (19).

**L-arjinin analogu olmayanlar:** iminoetil-L-ornitin (L-NIO), N-(1-iminoetil)-L-lizin, 1400W, merkaptometilguanidin, aminoguanidin, L-kanavanin (daha fazla iNOS'u inhibe ederler) ve 7-nitroindazol (7-NI; bu madde daha çok nNOS'u inhibe eder) (19).

#### 1. 4. 4. Nitrik Oksitin Organizmadaki Etkileri

Serbest radikal olarak nitelendirilebilen NO, merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, denge, koku alma gibi birçok fonksiyonda bir nörotransmitter olarak, periferik sistemde ise vazodilatasyon, solunum, genitoüriner ve gastrointestinal sistem fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunur. Dolaşım sisteminde trombosit agregasyonunun ve adezyonunun engellenmesi, kalp kasılmasının düzenlenmesi gibi olaylara da katılmaktadır (69, 80). İnsan T hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini düzenleyerek, apoptozisin uyarılmasını ya da inhibe edilmesini sağlayan NO (63), ayrıca serbest radikallerle reaksiyona girerek onları ortamdaki uzaklaştırmakta ve bir antioksidan gibi işlev görmektedir (26).

Nöronal ve endotelial NOS'in aksine uyarılabilir makrofaj NOS fazla miktarda NO oluşumunu sağlar ki, bu da bakteriler, mantarlar, parazitler dahil birçok patojenin etkisiz kılınmasını sağlar. Özellikle *mycobacterium tuberculosis* gibi hücre içi patojenleri elimine eder (69).

Sürekli NO üretiminin içinde mesane kanserinin de bulunduğu çeşitli habis tümörlere neden olabilecek inflamatuvar süreçlerden sorumlu olduğu bildirilmektedir (31, 98).

Biyolojik sistemlerde üretilen yüksek konsantrasyondaki NO'nun zararlı etkileri üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi, NO'nun oksijene benzer şekilde hücre içine girerek paylaşılmamış elektronlarından dolayı hücre içindeki proteinlerin yapısında bulunan demir gibi geçiş metallere bağlanması ve ortama serbest geçiş metallere salınmasıdır. İkincisi, otooksidasyon ile N-nitroso bileşiklerini oluşturarak DNA'ya hasar veren  $N_2O_3$  oluşturmasıdır. Üçüncüsü ise oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek DNA, proteinler ve hücre membran lipitlerini okside eden peroksinitriti üretmesidir (120).

**Tablo 1.** Nitrik Oksitin Biyolojik Etkileri (120)

Koruma	Düzenleme	Zararlı
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioksidan</li> <li>• Lökosit adezyonunu inhibisyonu</li> <li>• Tümör Nekroz Faktör (TNF) toksisitesine karşı koruma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasküler tonüsü düzenleme</li> <li>• Vasküler permeabilite</li> <li>• Sinir iletimi</li> <li>• Bronkodilatasyon</li> <li>• Platelet adezyonunun inhibisyonu</li> <li>• Renal fonksiyonlar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzim fonksiyonunun inhibisyonu</li> <li>• DNA'ya hasar verme</li> <li>• Lipid peroksidasyonunu uyarma</li> <li>• Radyasyon, alkil ajanlar ve toksik metallere karşı duyarlılığı artırma</li> <li>• Antioksidan depolarının tüketilmesi</li> </ul>

#### 1. 4. 5. Mistletoe Lektin-I ve Oksidan/Antioksidan Durum

ML-I'in serbest radikaller üzerine olan etkilerine bakılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, farelerde (112) ve RAW 264.7 makrofajlarda (59) NO salınımını uyardığı, SNP ile uyarılmış LLC-PK1 epitelyum hücrelerinde (61) ve LPS ile uyarılmış (67) RAW 264.7 makrofajlarında NO süpürücü aktivitesinin olduğu, dolayısıyla da NO üzerine düzenleyici rolünün olduğu ileri sürülmüştür.

ML-I ile yapılan *in vitro* çalışmalarda insan hepatokarsinom hücrelerinde reaktif oksijen miktarını artırarak bu hücrelerin apoptoza uğramasına yardımcı olduğu (62), nötrofillerden  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  salınımını uyardığı gösterilmiştir (110, 111).

Daha çok kanser tedavisi ve araştırmalarında kullanılan ökse otu ekstraktlarının antioksidan özelliğinin (6, 84, 87), üzerinde yetiştiği konakçının türüne, hasat zamanına (6) ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine (sulu, etanolik veya metanolik) göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (87).

Antioksidan özellik yönünden etken maddelerin fenolik asit ve flavonoidler olduğu (86, 88), fenolik bileşenlerin yanı sıra viskolektinlerin de ökse otunun antioksidan özelliğine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (96).

Barbasz ve ark (6). çam, köknar ve porsuk ağacı üzerinde yetişen ökse otlarını farklı mevsimlerde toplayıp, antioksidan içerik ve demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yönünden incelediklerinde ökse otunun demir indirgeyici gücünün üzerinde yetiştiği ağaç türünden fazla olmakla birlikte, en fazla kışın hasat edilenden, karotenoid içeriğinin ise yazın hasat edilenden elde edildiğini bildirmişlerdir.

Nwanjo, ökse otu yapraklarından elde ettiği sulu ekstraktların deneysel olarak diyabet oluşturdukları ratların kan ve karaciğer plazmasında MDA düzeyini anlamlı derecede düşürürken, GSH, SOD ve CAT düzeylerini yükselttiğini gözlemiştir (84).

Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda Avrupa ökse otunun üç alt türünün 500 mg/kg dozundaki ekstraktlarının GSH ve MDA düzeylerine etkisinin ökse otunun alt türüne ve kullanılan ekstraksiyon medotuna göre değiştiği ancak bu alt türlerin bazılarının böbrek ve kalp dokusu üzerinde antioksidan etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (87).

Shi ve ark. (102) *Viscum album* subsp. *coloratum* (Avrupa ökse otunun alt türü) bitkisinden elde ettikleri ökse otu alkalisinin karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>) verilmiş ratlarda SOD, GSH-Px ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) düzeylerinde anlamlı bir artış meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir.

*Viscum album* subsp. *coloratum* bitkisinin ekstraktlarından kromatografik yöntemlerle çeşitli bileşenler elde edildiği başka bir çalışmada, insan

nötrofil kültür ortamında  $O_2^-$  anyon süpürücü aktivitesinin viskolin bileşeninden elde edildiği bildirilmiştir (68).

N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda *Viscum articulatum* Burm. (Loranthaceae)'in metanolik ekstraktının antihipertansif etkilerine bakıldığı çalışmada, 4 hafta süre ile verilen L-NAME, 200 ve 400 mg/kg/gün dozundaki ekstraktların L-NAME'nin tamamen baskıladığı NO düzeylerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür (4).

### 1. 5. Sitokinler

Molekül ağırlığı 8-30 kDa arasında değişen, polipeptid yapısında, kısa etkili ve çözümlü özellikteki moleküllerdir. Hücrelerarası haberleşmede rol oynayan sitokinler, çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenlerler (55, 122).

Başlangıçta, sadece sitokinlerin lenfosit kaynaklı olduğu düşünüldüğünden lenfokin adı verilmiş, daha sonra monositlerin de bu maddeleri ürettiği görülmüş ve monokin adı kullanılmıştır (46). Günümüzde ise anti-sitokin ve moleküler problemlerin geliştirilmesiyle, bu mediyatörlerin aralarında endotel ve bazı epitelyum hücrelerinin de bulunduğu çeşitli doku hücreleri tarafından da sentezlenebildiği anlaşılmış ve genel anlamda sitokin terimi tercih edilmiştir. Sitokinler, sonradan kazanılmış immün yanıtın aktivasyon fazında lenfositlerin büyümesini ve farklılaşmasını uyarırken, doğuştan gelen ve sonradan kazanılmış immün yanıtın efektör fazında ise mikroorganizmaları ve diğer antijenleri elimine edecek farklı efektör hücreleri aktif hale getirmektedir (1).

Sitokinlerin genel özelliklerini kısaca özetlemek gerekirse:

- Sekresyonu kısa ve kendini sınırlayıcı olan sitokinlerin sentezi hücrel aktivasyon sonucu yeni bir gen transkripsiyonu ile gerçekleşir. Genellikle önceden oluşturulmuş moleküller gibi depolanmaz.

- Etkileri pleotropik (bir sitokin farklı hücelere etki etmesi) ve redundant (birden fazla sitokin aynı özelliğe sahip olması) olduğu gibi, lokal ve sistemik olabilir. Ayrıca bir sitokin fazla üretildiği zaman dolaşım sistemine geçerek üretildiği yerden uzaktaki hücelere etki (Endokrin etki) edebilir.
- Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin sentez ve etkilerini kolaylaştırır. Yani ikinci veya üçüncü sitokin birincinin biyolojik etkisine ortam hazırlayabilir.
- Hedef hüceler üzerindeki etkilerini hücre membranında bulunan özel reseptörlere bağlanarak gerçekleştirirler.
- Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu hücre dışı sinyallerle gerçekleşmektedir.
- Hücelerin sitokinlere yanıtları sıkı bir kontrol altında olup, bu yanıtları kısıtlayacak feedback inhibitör mekanizmaları vardır (1, 46).

### 1. 5. 1. Sitokinlerin Sınıflandırılması

Sitokinler aralarındaki fonksiyonel benzerliklere ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadırlar (55).

**Tablo 2.** Sitokinlerin Sınıflandırılması (55)

<b>Familya</b>	<b>Aktiviteler</b>
Tümör nekroz faktörleri; TNF- $\alpha$ ve TNF- $\beta$	IL-1'e benzer aktivite ve tümör sitotoksitesi
Kemokinler; IL-8, Monosit kemotaktik faktör (MCF)	Lökositlerin kemotaksisi ve aktivasyonu
İnterlökinler; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra ve IL-2-IL-26	Doğuştan gelen ve sonradan kazanılmış immünitenin düzenlenmesi
İnterferonlar; INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ ve INF- $\gamma$	Antiviral, İmmünoregülatuar
Koloni uyarıcı faktörler; Granülosit uyarıcı faktör (G-UK), Makrofaj uyarıcı faktör (M-UK), IL-3, 5, 6 ve 7	Miyelopoiesis
Nötropinler ve nöropoietinler; Siliar nörotrofik faktör, Sinir büyüme faktörü, IL-6	Sinirlerin büyümesi ve farklılaşması
Büyüme faktörleri; Fibroblast büyüme faktörü, Endotel hücresi büyüme faktörü	Hücre büyümesinin düzenlenmesi



### 1. 5. 1. 1. Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Carswell ve ark. 1975 yılında BCG (Bacillus Calmette-Guerin) verilmiş farelere endotoksin verildiğinde serumda oluşan faktörün neoplastik hücrelerin üremesini inhibe ederken, embriyo fibroblastlarının büyümesini inhibe etmediğini görmüşler ve bu maddeye TNF (Tümör Nekroz Faktör) adını vermişlerdir (20). 1985'te Aggarwal ve ark. (2) Moleküler ağırlığı 17 kDa olan insan TNF- $\alpha$ 'sını HL-60 hücre serisi süpernatantlarından saflaştırmışlardır. Yine aynı yıl Beutler ve ark. (9) lipopolisakkarit verilmiş farelerde oluşan kaşeksinin sebebinin kaşektin olduğunu ve daha sonraki çalışmalarında kaşektin ile TNF- $\alpha$ 'nın aynı madde olduğunu bildirmişlerdir.

Makrofajlar, monositler, lenfositler, NK hücreleri, beyin mikrogial hücreleri ve karaciğerin kuppfer hücreleri gibi farklı hücrelerde sentezlenen sitokin olan TNF- $\alpha$ , infeksiyon, doku hasarı ve inflamasyon patogenezinde primer bir araçtır. Sentezini bakteriyel endotoksinler, enterotoksinler, toksin-1, mikobakteriyel kord faktörü, virüsler, C5a, mantarlar veya parazitik ajanlar, interlökinler ve interferonlar başlatabilir (85).

TNF- $\alpha$ , endotel hücrelerini hücre-içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1), endotelial lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) sentezi için uyarır. Ayrıca endotel hücrelerinde hücre yüzeyi prokoagulant aktivitesini, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu ve IL-1'in sekresyonunu uyarır. Bu aktivitelerin hepsi birlikte, artmış bir inflamatuvar yanıtı ve damar-içi koagülasyona neden olur ve sonuçta hemorajik nekroz meydana gelir (13).

Tek çekirdekli fagositlerde, amino ucu hücre içine, karboksi grubu ise hücreler arası boşluğa gelen TNF- $\alpha$ , non-glikolize tip II membran proteini olarak sentezlenmektedir. TNF- $\alpha$ 'nın membran formu membranda bulunan metalloproteinaz enzimi vasıtasıyla parçalanır ve 17 kDa'luk üç polipeptid zinciri ve bunların da polimerleşmesiyle 51 kDa'luk piramit şekilli çözünür

TNF- $\alpha$  oluşur. Reseptöre bağlanma bölgeleri her bir yüzün alt kısmında bulunmaktadır ve aynı anda farklı üç reseptöre bağlanma olanağı sağlar (1).

Normal olmayan TNF- $\alpha$  üretimi ve TNF reseptörleri sinyalleşmesinin romatoid artrit, Crohn's hastalığı (43), ateroskleroz, psoriasis, sepsis, diyabet ve obezite gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi bulunmaktadır (85, 89).

TNF- $\alpha$  etkilerini hücre yüzeyinde bulunan ve hemen hemen bütün hücreler tarafından eksprese edilen iki farklı hücre yüzey reseptörü (p55TNF-R1 ve p75TNF-R2) sayesinde gerçekleştirmektedir. p55TNF-R1 hücrede sürekli ve düşük bir düzeyde eksprese edilirken, p75TNF-R2 ise hücreler arası uyarılara bağlı olarak hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel düzeyde kontrollü olarak eksprese edilmektedir (83).

Membran bağımlı p55TNF-R1 ve p75TNF-R2 reseptörleri de proteolitik olarak parçalanıp, dolaşımda çözünebilir formda bulunabilir ve yine çözünebilir formdaki TNF $\alpha$ 'lara bağlanarak ya TNF- $\alpha$  aktivitesini bloke eder ya da TNF- $\alpha$ 'nın aktivitesini sürdürmesi için gerekli trimerik yapısını stabilize eder. Dolayısıyla bu reseptörlerin TNF- $\alpha$  aktivitesini düzenleyici rolleri de bulunmaktadır (44).

TNF- $\alpha$ , interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) gibi bazı sitokinler hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu, dolayısıyla da lökosit ve endotel arasındaki bağlanmayı arttırmaktadır. Hücre adezyon molekülleri (CAMs; Cellular adhesion molecules) dolaşımdaki lökositlerin inflamasyon bölgesindeki damar endoteline bağlanmasını ve ayrıca lökositlerin kandan inflamasyonlu bölgeye göçünü sağlarlar. Hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu sağlayacak sinyallerin yokluğunda, lökositler ve damar endoteli arasındaki bağlayıcı kuvvetler, lökositlerin bağlanması için gerekli eşik değerinin altında kalmaktadır (76).

TNF- $\alpha$ , etkisini hücrelerin sayısının artırılması, aktivasyonu ve farklılaşması şeklinde göstermekte ve apoptozisi uyarmaktadır. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, granülosit makrofaj kolonisi uyarıcı faktör (GM-CSF), lösemi

inhibitör faktör (LIF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), prostaglandin E2 (PGE2) ve bazı adezyon moleküllerinin (E-selektin, hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)) ekspresyonunu arttırmaktadır. Aşırı TNF- $\alpha$  üretimi, akut bakteriyel enfeksiyonlarda septik şoka, kronik vakalarda ise kaşeksiye neden olmaktadır (91).

### 1. 5. 2. Mistletoe Lektin-I ve TNF- $\alpha$ İlişkisi

ML-I ile yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında monosit/makrofaj, granülosit ve NK gibi hücrelerden TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını (48, 49), kullanılan hücre tipi ve hücrenin üretildiği ortama, lektinin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine göre değişen miktarda arttırdığı kaydedilmiştir (74, 90, 95).

Hajto ve ark., (48) *in vitro* ortamda insan monositlerini 24 saat 0-0,5-1-10-50-100-500-1000 ng/ml ML-I ile inkübe ettikleri ve ayrıca sekiz kanserli hastaya tek sefer 1 ng/kg dozunda ML-I'i intravenöz olarak enjekte edip, serum TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 düzeylerindeki değişiklikleri inceledikleri araştırmalarında; TNF- $\alpha$  düzeyinin kültür ortamında 10 ng/ml ML-I konsantrasyonunda, kanserli hastaların serumlarında ise 3. saatte en yüksek değerinde olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hajto ve ark. (49) yaptıkları başka bir çalışmada insan monositlerini *in vitro* ortamda 24 saat farklı dozlardaki (1ng/ml-1 $\mu$ g/ml) ML-I ile inkübe etmişler ve hücreler için sitotoksik olmayan ML-I dozlarında (1 ve 10 ng/ml) IL-1 $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , IL -6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör ve IL-10 salınımında bir artış olduğu bildirmişlerdir.

Ribereau-Gayon ve ark. (95), insan monositlerinin *in vitro* ortamda 0,02-2000 pg/ml ML-I ile 18 saat inkübe edilmesi sonucu en yüksek TNF- $\alpha$  salınımının 0,02 pg/ml lektin konsantrasyonunda olduğunu, yüksek konsantrasyonlarda ise TNF- $\alpha$  salınımının azaldığını bildirmişler ve bunun

lektinin toksik etkisine ve/veya artan TNF- $\alpha$ 'nın hücreleri öldürebileceği nedenine bağlamışlardır.

Sung ve ark. (108) RAW 264.7 makrofaj hücrelerini, 0, 0,25, 1 ve 2  $\mu\text{g/ml}$  dozundaki normal, radyasyona ve sıcaklığa maruz bırakılmış ökse otu lektini ile 24 saat inkübe ettiklerinde, normal lektin ile inkübe edilen makrofajlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik etkiden dolayı hücre sayısında ve TNF- $\alpha$  düzeyinde bir azalma olduğunu ancak çalışmaları için sitotoksik doz olan 2  $\mu\text{g/ml}$  lektin dozunu, 5 kGy (kilogray) üzerindeki radyasyon ve sıcaklığa maruz bıraktıklarında, TNF- $\alpha$  düzeyinde tekrar bir artış olduğunu bildirmişlerdir, bunun nedenini sıcaklığın lektinin B zincirini tahrip etmesine, radyasyonun ise lektin üzerinde yapısal değişikliklere yol açmasından kaynaklanabileceğine bağlamışlardır.

Göğüs kanserli 36 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada 12 hafta boyunca haftada iki kez 1ng/kg dozundaki ML-I subkutanöz olarak verilmiş ve lektinin immün sistemdeki tek çekirdekli hücrelerden aralarında TNF- $\alpha$ 'nında bulunduğu sitokinlerin salınımını arttırdığı bildirilmiştir (53).

Boneberg ve Hartung (11) gönüllülerden alınan tam kan örnekleri ile yaptıkları çalışmalarında, 0,01-10 ng/ml aralığındaki ML-I dozlarının tek başına aralarında TNF- $\alpha$ 'nında bulunduğu sitokinlerin salınımını arttırmadığını ancak tam kanın LPS ile uyarıldığında 2 ng/ml ML-I'in 6. saatte TNF- $\alpha$  salınımı için en etkin doz olduğunu bildirmişlerdir. TNF- $\alpha$  düzeyinin artmasını ML-I'in interlökin-10 üretimini inhibe etmesine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2. 1. Materyal

Araştırma için Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Karar no: KAÜ-HADEK/2011-16) onay alındı. Araştırma materyalini Erzurum Atatürk Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezin'den satın alınan, 12-18 aylık, 28 adet Yeni Zelanda ırkı tavşan oluşturdu. Üç hafta süre ile Kafkas Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma ve Uygulama Ünitesi'nde kafeslerde uyum sürecine alınan tavşanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Üç hafta sonunda tartılarak, canlı ağırlık ortalaması  $3,55 \pm 0,53$  kg olarak belirlenen tavşanlar dört gruba ayrıldı.

#### 2. 1. 1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her bir grupta 7 adet tavşan olmak üzere aşağıdaki deney grupları oluşturuldu.

**Kontrol** : Tavşanlara deney esnasında bir kez olmak üzere 0,5 ml/kg serum fizyolojik intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi.

**Grup I** : Tavşanlara deney esnasında bir kez olmak üzere 0,5 ng/kg ML-I, i.p olarak enjekte edildi.

**Grup II** : Tavşanlara deney esnasında bir kez olmak üzere 1 ng/kg ML-I, i.p olarak enjekte edildi.

**Grup III** : Tavşanlara deney esnasında bir kez olmak üzere 2 ng/kg ML-I, i.p olarak enjekte edildi.

## 2. 1. 2. Kan Örneklerinin Alınması

ML-I uygulamasından sonra 1., 6., 12. ve 24. saatlerde tavşanların kulak venalarından heparinli tüplere alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analizler yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı. Plazma TAK ve TOK düzeyleri ticari kitle (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep-Türkiye) kolorimetrik olarak, TNF- $\alpha$  düzeyi ELISA (rabbit- TNF- $\alpha$ , R&D System kiti) kiti kullanılarak ölçüldü. NO düzeyleri ise Miranda ve ark. (78)'nın bildirdikleri yöntemle göre tayin edildi.

## 2. 2. Metot

### 2. 2. 1. Analizler İçin Kullanılan Cihazlar

1. Mikroplak okuyucu (Biotek, Powerwave XS)
2. Spektrofotometre (UV-1201, Shimadzu)
3. Santrifüj (Hettich, Mikro 200)
4. Etüv (Labart)
5. Vorteks (Velp Scientifica, Zx classic)
6. Mikroplak çalkalayıcı (Biosan, PSU-2T)
7. Distile su cihazı (GFL, Water Stills 2004)
8. Hassas terazi (Denver Instrument, TP-214)
9. Manyetik karıştırıcı (Wisestir, MSH-20A)
10. pH metre (Orion 3 Star)
11. Otomatik pipetler (Eppendorf, 10-1000  $\mu$ l)
12. Multikanal pipet (Socorex)
13. Stepper pipet (Socorex)

## 2. 2. 2. Analizler İçin Kullanılan Kimyasallar

1. Mistletoe Lektin-I (Sigma-Aldrich)
2. Çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) (Sigma-Aldrich)
3. Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich)
4. Vanadyum (III) klorür ( $VCl_3$ ) (Merck)
5. Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
6. Sülfanilamid (SULF) (Alfa-aesar)
7. N-(1-Naftil)etilendiamindihidroklörür (NEDD) (Alfa-aesar)
8. Sodyum nitrit ( $NaNO_2$ ) (Sigma-Aldrich)
9. Sodyum nitrat ( $NaNO_3$ ) (Sigma-Aldrich)

## 2. 2. 3. TNF- $\alpha$ Analizi

### 2. 2. 3. 1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Kaplama (Birincil) Antikoru:** 360  $\mu$ g/ml fare anti-tavşan TNF- $\alpha$  1 ml fosfat tamponu (PBS) içerisinde çözüldü.

**Tespit (İkincil) Antikoru:** 18  $\mu$ g/ml biyotinli keçi anti-tavşan TNF- $\alpha$  sulandırma ayıracı içerisinde çözüldü.

**Standart:** 100 ng/ml rekombinant tavşan TNF- $\alpha$  0,5 ml sulandırma ayıracı içerisinde çözüldü.

**Streptavidin-HRP:** 1ml streptavidin bağlanmış horseradish-peroxidaz kullanıldı.

**Fosfat Tamponu (PBS):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, distile su içerisinde pH 7,2-7,4 olacak şekilde çözülerek, filtre edildi.

**Yıkama Tamponu :** % 0,05 Tween 20 PBS'de çözülerek, pH 7,2-7,4'e ayarlandı.

**Sulandırma Ayıracı:** % 1 Sığır Serum Albumin (BSA) PBS'de çözülerek, pH 7,2-7,4 olarak ayarlandı ve filtre edildi.

**Substrat Çözeltisi:** Ayıraç A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile ayıraç B (Tetramethylbenzidine) 1:1 oranında karıştırıldı.

Durdurma çözeltisi olarak 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanıldı.

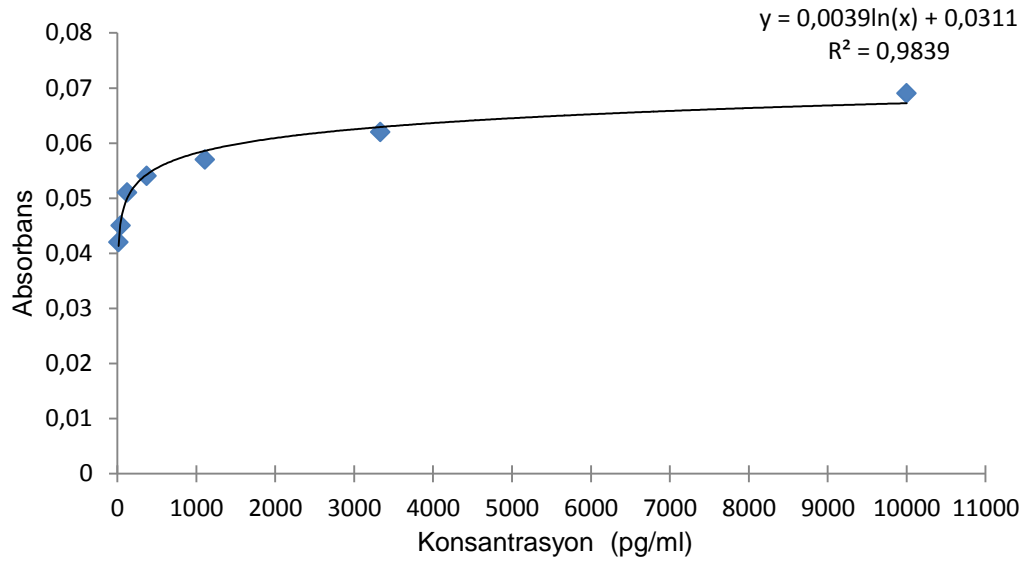
### **2. 2. 3. 2. Mikroplakların Kaplanması**

Mikroplağın her bir kuyucuğuna 2 µl kaplama antikoru pipetlendi ve üstleri kapatılarak bir gece oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Ardından her bir kuyucuğa 400 µl yıkama tamponu konularak mikroplaklar toplam üç kez yıkandı. Daha sonra kuyucuklara 300 µl sulandırma ayıracı pipetlenerek bir saat oda ısısında inkübe edildi ve mikroplaklar tekrar yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.

### **2. 2. 3. 3. Standart Eğrinin Hazırlanması**

100 ng/ml rekombinant tavşan TNF-α, 0,5 ml sulandırma ayıracı içerisinde çözüldü ve bu çözüldü ve bu çözüldüden 8000 – 4000 – 2000 – 500 – 125 - 62,5 - 31,25 - 15,625 pg/ml'lik çalışma standartları hazırlandı. TNF-α ölçümünde kullanılan reaktifler eklendikten sonra 450 nm'de okuma yapıldı ve standart grafiği çizildi.





**Grafik 1.** TNF- $\alpha$  Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği

#### 2. 2. 3. 4. Deneyin Yapılışı

Kuyucuklara 100  $\mu$ l standart ve 100  $\mu$ l numune pipetlendi. 2 saat oda ısısında inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile üç kez yıkanıp kalıntı kalmaması için iyice aspire edildi. Bütün kuyucuklara 100  $\mu$ l tespit antikoru pipetlenerek tekrar oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Mikroplak, yıkama tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra aspire edildi. 100  $\mu$ l streptavidin-HRP bütün kuyucuklara pipetlendi ve 20 dakika oda ısısında inkübasyona bıraktıktan sonra yine yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. 100  $\mu$ l substrat çözeltisi bütün kuyucuklara eklenerek 20 dakika oda ısısında bırakıldı. Daha sonra 50  $\mu$ l durdurma çözeltisi eklenerek çalkalandı ve mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda kuyucukların absorbans değerleri okundu ve standart grafiğinden faydalanarak konsantrasyonlar kaydedildi.

**Tablo 3. TNF- $\alpha$  Analizi**

	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Standart</b>	100 $\mu$ l	-
<b>Plazma</b>	-	100 $\mu$ l
Oda ısısında 2 saat inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile üç kez yıkandı		
<b>Tespit Antikoru</b>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Oda ısısında 2 saat inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile üç kez yıkandı		
<b>Streptavidin-HRP</b>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Oda ısısında 20 dakika inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile üç kez		
<b>Substrat Çözeltisi</b>	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>Durdurma Çözeltisi</b>	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
450 nm'de okuma		

## 2. 2. 4. Nitrik Oksit Analizi

### 2. 2. 4. 1. Deneyin Prensibi

Nitrat, Vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülmekte ve nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil)etilendiamindihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşmaktadır. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm'de ölçülür. Nitrat ve nitrit düzeyleri ayrı ayrı belirlendikten sonra ikisinin toplamı NO miktarını göstermektedir (78).

#### 2. 2. 4. 2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Çinko Sülfat (% 10):** 10 g çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ) distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sodyum Hidroksit (0,3 M):** 1,2 g sodyum hidroksit (NaOH) distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Vanadyum (III) Klorür (% 0,8):** 800 mg vanadyum (III) klorür ( $VCl_3$ ) 1 M HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**1 M HCl:** İçinde bir miktar distile su bulunan balon jöjeye 8,29 ml HCl (d: 1,19; % 37; MA: 36,46) ilave edilerek karıştırıldı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sülfanilamid (% 2):** 2 g sülfanilamid % 5'lik HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**NEDD (% 0,1):** 100 mg N-(1-Naftil)etilendiamindihidroklörür distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Griess Ayıracı:** 50 ml % 0,1 NEDD ve 50 ml % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırıldı.

**Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM):** 6,9 mg  $NaNO_2$  distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM):** 8,5 mg  $NaNO_3$  distile suda çözülerek hacim 100ml'ye tamamlandı.

### **2. 2. 4. 3. Standart Eğrinin Hazırlanması**

1 mM'lık stok nitrit ve nitrat çözeltilerinden 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 µM'lık çalışma standartları hazırlandı. Her bir standarttan iki kuyucuk olmak üzere 100 µl pipetlendikten sonra nitrit ve nitrat ölçümlerinde kullanılan reaktifler (VCl<sub>3</sub> ve Griess ayıracı) eklenip, 540 nm'de köre karşı absorbanları okundu. Ortalama değerleri alınarak standart eğrileri çizildi. Nitrit ve nitrat için standart eğrileri Grafik 2 ve Grafik 3'te sunuldu.

### **2. 2. 4. 4. Numunelerin Deproteinize Edilmesi**

400 µl serumun üzerine 200 µl 0,3 M NaOH ilave edilerek vortekslendi ve 5 dakika beklendikten sonra 200 µl % 10'luk ZnSO<sub>4</sub> eklenerek tekrar vortekslendi. Numuneler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak sıvı analiz için ayrıldı.

### **2. 2. 4. 5. Nitrat Analizi**

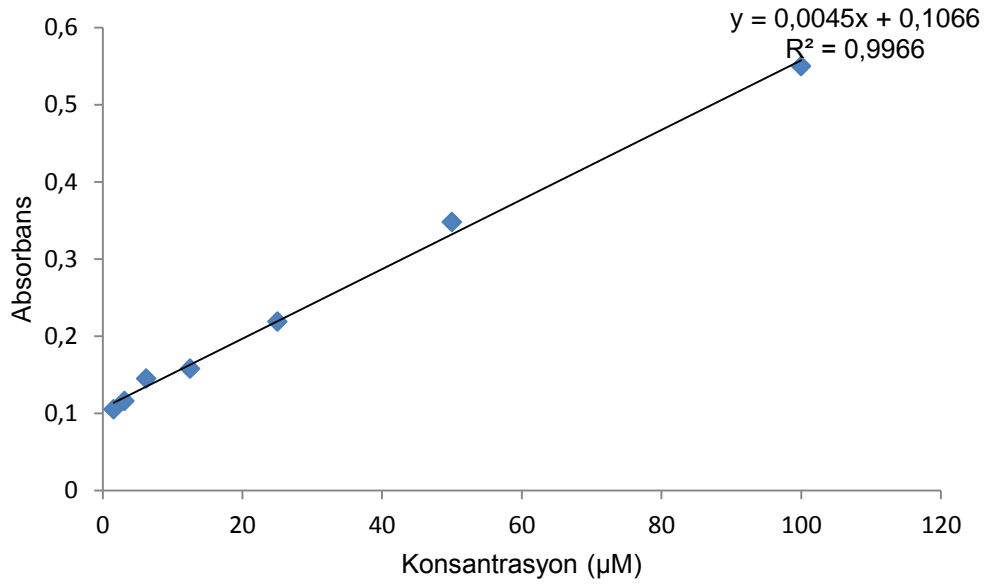
Mikroplak kuyucuklarına 100 µl distile su, 100 µl numune, 100 µl VaCl<sub>3</sub> ve 100 µl Griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika 37<sup>0</sup>C'de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanlar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrat standart grafiğinden yararlanarak konsantrasyonlar kaydedildi.

**Tablo 4.** Nitrat Analizi

	Kör	Test
Distile Su	100 µl	-
Plazma	-	100 µl
Vanadyum(III) Klorür	100 µl	100 µl
Griess Ayıracı	100 µl	100 µl

37<sup>0</sup>C'de 30 dakika inkübasyon

540 nm'de okuma

**Grafik 2.** Nitrat Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği

### 2. 2. 4. 6. Nitrit Analizi

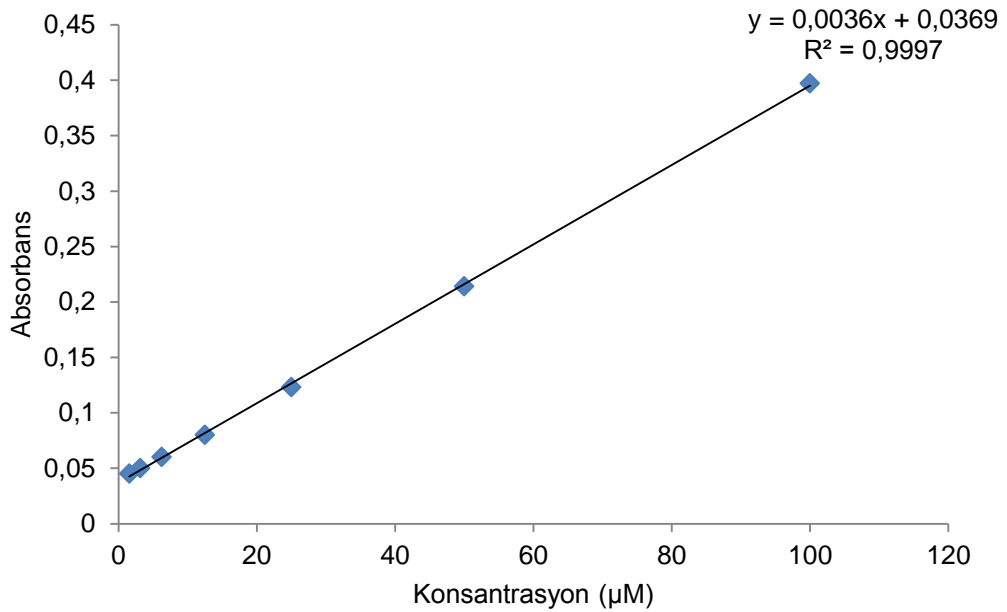
Mikroplak kuyucuklarına 100 µl distile su, 100 µl numune ve 100 µl griess ayırıcı pipetlendi. 30 dakika 37°C'de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrit standart grafiğinden yararlanarak konsantrasyonlar kaydedildi.

**Tablo 5.** Nitrit Analizi

	Kör	Test
<b>Distile Su</b>	100 µl	-
<b>Plazma</b>	-	100 µl
<b>Griess Ayırıcı</b>	100 µl	100 µl

37°C'de 30 dakika inkübasyon

540 nm'de okuma



**Grafik 3.** Nitrit Düzeyinin Saptanmasında Kullanılan Standart Grafiği

### 2. 2. 4. 7. Sonuçların Hesaplanması

Kalibrasyon eğrisinden nitrat ve nitrit konsantrasyonları bulundu ve nitrik oksit konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{Nitrik Oksit } (\mu\text{M}) = \text{Nitrat } (\mu\text{M}) + \text{Nitrit } (\mu\text{M})$$

### 2. 2. 5. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi

#### 2. 2. 5. 1. Deneyin Prensibi

Numunede bulunan antioksidan maddelerin mavi-yeşil renkli ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)] radikali ile reaksiyona girerek bileşimin renginde azalmaya ya da rengin kaybolmasına neden olması prensibine dayanmaktadır. Renk değişimi ile numune içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Standart olarak E vitamini analogu olan trolox kullanılmakta ve sonuç mmol Trolox equiv./L olarak ifade edilmektedir (35).

#### 2. 2. 5. 2. Kullanılan Reaktif ve Standartlar

**Reaktif 1:** Asetat Tamponu

**Reaktif 2:** Renklendirilmiş ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)] radikal solüsyonu

**Standart 1:** Kör solüsyonu (deiyonize su)

**Standart 2:** 1,0 mmol Trolox Equiv./L solüsyonu

### 2. 2. 5. 3. Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve test olmak üzere işaretlenen tüm kuyucuklara 250 µl reaktif 1'den pipetlendikten sonra kör kuyucuğuna 15 µl standart 1, standart kuyucuğuna 15 µl standart 2 ve test kuyucuğuna 15 µl plazma eklenerek, 660 nm'de ilk okuma yapıldı. Kuyucuklara reaktif 2'den 37,5 µl pipetlenerek 37<sup>0</sup>C'deki 5 dakikalık inkübasyonu takiben 660 nm'de ikinci okuma yapıldı ve absorbanslar kaydedildi.

**Tablo 6.** Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Standart 1</b>	15 µl	-	-
<b>Standart 2</b>	-	15 µl	-
<b>Plazma</b>	-	-	15 µl
<b>Reaktif 1</b>	250 µl	250 µl	250 µl
660 nm'de ilk okuma			
<b>Reaktif 2</b>	37,5 µl	37,5 µl	37,µl
37 <sup>0</sup> C'de 5 dakika inkübasyon			
660 nm'de ikinci okuma			



#### 2. 2. 5. 4. Sonuçların Hesaplanması

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Örnekte})] / [(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

$\Delta$  Standart 1'in absorpsansı = (Std 1'in ikinci absorpsansı - Std 1'in ilk absorpsansı)

$\Delta$  Standart 2'nin absorpsansı = (Std 2'in ikinci absorpsansı - Std 2'in ilk absorpsansı)

$\Delta$  Örneğin absorpsansı = (Testin ikinci absorpsansı - Testin ilk absorpsansı)

#### 2. 2. 6. Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi

##### 2. 2. 6. 1. Deneyin Prensipli

Örnekte bulunan oksidanlar  $\text{Fe}^{+2}$ -o-dianisidin kompleksini ferri ( $\text{Fe}^{+3}$ ) iyona oksitlerler.  $\text{Fe}^{+3}$  asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanılmakta ve sonuç  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{Equiv./L}$  olarak ifade edilmektedir (36).

##### 2. 2. 6. 2. Kullanılan Reaktif ve Standartlar

**Reaktif 1:** 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde çözülmüş 150  $\mu\text{M}$  xilenol orange, 140 mM NaCl ve 1,35 M gliserol çözeltisi

**Reaktif 2:** 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içerisinde çözülmüş, 5 mM  $\text{Fe}^{+2}$  ve 10 mM o-dianisidin çözeltisi

**Standart 1:** Kör solüsyonu (deiyonize su)

**Standart 2:** Stabilize edilmiş standart stok solüsyonu (SSSS) (800 mM  $\text{H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$ )

Teste başlamadan önce standart solüsyonunu hazırlamak için, SSSS 40.000 kat sulandırıldı. 50 µl stok solüsyonu, 10 ml deiyonize su içerisine katıldı ve vortekslendi (birinci basamak dilüsyonu). Daha sonra hazırlanan bu solüsyondan tekrar 50 µl alınarak 10 ml deiyonize su ilave edildi ve vortekslendi (ikinci basamak dilüsyonu). Böylelikle final konsantrasyonu 20 mikromolar olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart solüsyonu hazırlanmış oldu.

### **2. 2. 6. 3. Deneyin Yapılışı**

Mikroplağın kuyucukları kör, standart ve test olmak üzere işaretlendi ve bütün kuyucuklara 250 µl reaktif 1 pipetlendikten sonra kör kuyucuğuna 37,5 µl standart 1, standart kuyucuğuna 37,5 standart 2 ve test kuyucuklarına 37,5 µl plazma eklenerek, 530 nm'de ilk okuma yapıldı. Kuyucuklara reaktif 2'den 12,5 µl pipetlenerek 37<sup>0</sup>C'deki 5 dakikalık inkübasyonu takiben 530 nm'de ikinci okuma yapıldı ve absorbanlar kaydedildi.

**Tablo 7.** Total Oksidan Kapasite (TOK) Analizi

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
<b>Standart 1</b>	37,5 µl	-	-
<b>Standart 2</b>	-	37,5 µl	-
<b>Plazma</b>	-	-	37,5 µl
<b>Reaktif 1</b>	250 µl	250 µl	250 µl
530 nm'de ilk okuma			
<b>Reaktif 2</b>	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
37 <sup>0</sup> C'de 5 dakika inkübasyon			
530 nm'de ikinci okuma			

#### 2. 2. 4. Sonuçların Hesaplanması

Sonuç =  $[(\Delta\text{Abs Örne}) / (\Delta\text{Abs Std2})] \times 20$  (Std 2 değeri)

$\Delta\text{Abs Örne}$  = Testin ikinci absorbansı – Testin ilk absorbansı

$\Delta\text{Abs Std2}$  = Standart 2'nin ikinci absorbansı – Standart 2'nin ilk absorbansı

Std 2 değeri = 20 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Equiv./L

### **2. 2. 7. İstatistiksel Analizler**

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS.16 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki ortalama değerler tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası farklılıklar duncan testi, gruplardaki negatif (-) ya da pozitif (+) ilişkinin araştırılması korelasyon analizi ile belirlendi. Sonuçlar; ortalama ( $\pm$ ) ve standart hata ( $x \pm Sx$ ) olarak verildi.

### 3. BULGULAR

Çalışmadan elde edilen plazma TNF- $\alpha$ , NO, TAK ve TOK düzeylerine ait veriler ve istatistiksel önemi Tablo 8, bulguların grafiksel değerlendirmesi ise Grafik 4, 5, 6, 7 ve 8'de sunuldu.

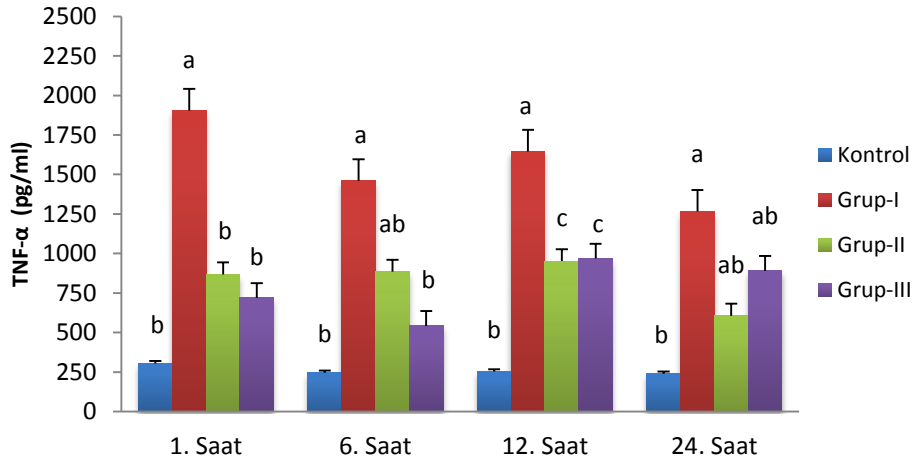
**Tablo 8.** ML-I Verilen Tavşanlarda TNF- $\alpha$ , NO, TAK ve TOK Düzeyleri

Parametre	Örnek Alım Zamanları	Gruplar				P
		Kontrol	Grup-I	Grup-II	Grup-III	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	1.Saat	304,12 $\pm$ 38,66 <sup>A, b</sup>	1904,78 $\pm$ 420,93 <sup>A, a</sup>	867,53 $\pm$ 259,78 <sup>A, b</sup>	717,98 $\pm$ 98,49 <sup>A, b</sup>	**
	6.saat	244,08 $\pm$ 74,86 <sup>A, b</sup>	1458,99 $\pm$ 499,58 <sup>A, a</sup>	884,91 $\pm$ 66,22 <sup>A, ab</sup>	541,16 $\pm$ 92,78 <sup>A, b</sup>	*
	12.saat	253,11 $\pm$ 46,53 <sup>A, b</sup>	1645,21 $\pm$ 340,20 <sup>A, a</sup>	951,29 $\pm$ 134,64 <sup>A, c</sup>	954,23 $\pm$ 149,89 <sup>A, c</sup>	*
	24.saat	238,04 $\pm$ 20,35 <sup>A, b</sup>	1265,13 $\pm$ 380,17 <sup>A, a</sup>	606,34 $\pm$ 54,46 <sup>A, ab</sup>	889,97 $\pm$ 188,80 <sup>A, ab</sup>	*
	P	Ns	Ns	Ns	Ns	
NO ( $\mu$ mol/L)	1.Saat	49,91 $\pm$ 6,95 <sup>A, a</sup>	29,67 $\pm$ 2,98 <sup>B, b</sup>	30,87 $\pm$ 6,71 <sup>B, b</sup>	42,68 $\pm$ 4,12 <sup>B, ab</sup>	*
	6.saat	38,09 $\pm$ 4,88 <sup>AB, a</sup>	34,46 $\pm$ 3,55 <sup>AB, a</sup>	34,66 $\pm$ 3,52 <sup>B, a</sup>	45,81 $\pm$ 5,63 <sup>B, a</sup>	Ns
	12.saat	42,41 $\pm$ 3,22 <sup>AB, a</sup>	50,65 $\pm$ 7,60 <sup>A, a</sup>	54,21 $\pm$ 2,87 <sup>A, a</sup>	59,95 $\pm$ 2,35 <sup>A, a</sup>	Ns
	24.saat	31,92 $\pm$ 5,57 <sup>B, a</sup>	35,73 $\pm$ 6,08 <sup>AB, a</sup>	38,78 $\pm$ 6,75 <sup>AB, a</sup>	43,01 $\pm$ 4,12 <sup>B, a</sup>	Ns
	P	Ns	Ns	*	*	
TAK (mmol Trolox Equiv./L)	1.Saat	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>A, a</sup>	0,33 $\pm$ 0,05 <sup>A, a</sup>	0,24 $\pm$ 0,05 <sup>A, a</sup>	0,25 $\pm$ 0,07 <sup>A, a</sup>	Ns
	6.saat	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>A, a</sup>	0,17 $\pm$ 0,04 <sup>B, a</sup>	0,18 $\pm$ 0,02 <sup>A, a</sup>	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>A, a</sup>	Ns
	12.saat	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>A, a</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>B, a</sup>	0,20 $\pm$ 0,04 <sup>A, a</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>A, a</sup>	Ns
	24.saat	0,17 $\pm$ 0,03 <sup>A, a</sup>	0,16 $\pm$ 0,03 <sup>B, a</sup>	0,16 $\pm$ 0,02 <sup>A, a</sup>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>A, a</sup>	Ns
	P	Ns	*	Ns	Ns	
TOK ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv./L)	1.Saat	9,68 $\pm$ 1,26 <sup>A, a</sup>	7,29 $\pm$ 0,63 <sup>A, a</sup>	7,93 $\pm$ 0,36 <sup>A, a</sup>	6,99 $\pm$ 0,85 <sup>A, a</sup>	Ns
	6.saat	9,38 $\pm$ 0,78 <sup>A, a</sup>	7,81 $\pm$ 0,72 <sup>A, a</sup>	8,29 $\pm$ 0,58 <sup>A, a</sup>	8,75 $\pm$ 1,61 <sup>A, a</sup>	Ns
	12.saat	7,35 $\pm$ 0,33 <sup>A, b</sup>	8,14 $\pm$ 0,46 <sup>A, ab</sup>	9,06 $\pm$ 0,61 <sup>A, a</sup>	7,84 $\pm$ 0,28 <sup>A, ab</sup>	Ns
	24.saat	7,19 $\pm$ 0,55 <sup>A, a</sup>	7,93 $\pm$ 0,55 <sup>A, a</sup>	8,64 $\pm$ 1,19 <sup>A, a</sup>	7,16 $\pm$ 0,45 <sup>A, a</sup>	Ns
	P	Ns	Ns	Ns	Ns	

A, B harfleri aynı sütündeki, a, b, c harfleri aynı satırdaki istatistiksel farkları göstermektedir, \*: Aynı satır ve sütündeki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05), \*\*: Aynı satırdaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0,01), Ns: Aynı satır ve sütündeki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir.

### 3. 1. Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Düzeyleri

Yapılan çalışmada kontrol ve deneme gruplarında plazma TNF- $\alpha$  düzeyleri sırasıyla 1. saatte 304,12, 1904,78, 867,63, 717,98, 6. saatte 244,08, 1458,99, 884,91, 541,16, 12. saatte 253,11, 1645,21, 951,29, 954,23, 24. saatte 238,04, 1265,13, 606,34, 889,97 pg/ml olarak bulundu.



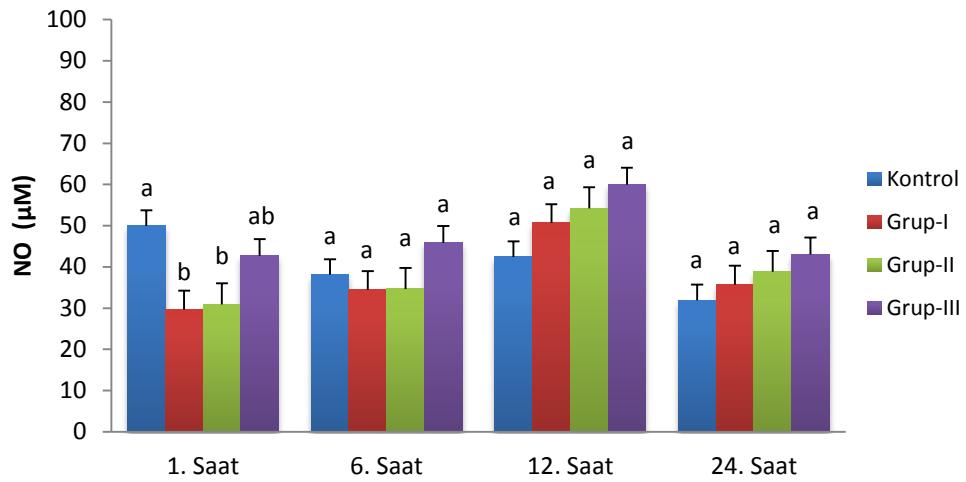
**Grafik 4.** ML-I Verilen Tavşanlarda Gruplar Arası TNF- $\alpha$  Değerleri

Farklı dozlarda ML-I verilen gruplar kıyaslandığında; bütün grupların 12. saatteki TNF- $\alpha$  düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek ( $p < 0,05$ ) olduğu, 0,5 ng/kg ML-I verilen grubun TNF- $\alpha$  düzeylerinin 1, 6, 12, ve 24. saatlerde diğer gruplara göre önemli bir artış ( $p < 0,01$ ) gösterdiği gözlemlendi.

Çalışmada kontrol ve ML-I verilen gruplardan alınan numuneler grup içi saatlere göre mukayese edildiğinde, 1, 6, 12 ve 24. saatlerdeki TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişimin olmadığı saptandı.

### 3. 2. Nitrik Oksit (NO) Düzeyleri

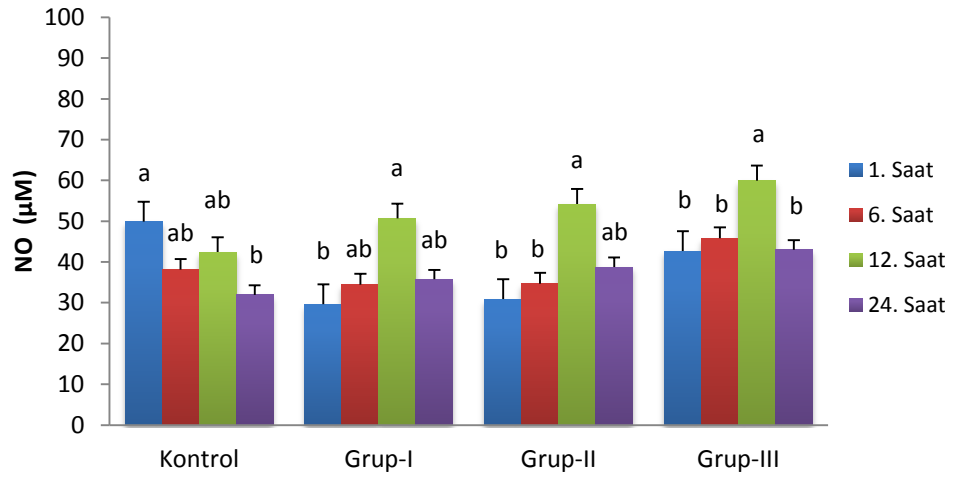
Kontrol ve deneme grupları plazma NO düzeyleri sırasıyla 1. saatte 49,91, 29,67, 30,87, 42,68, 6. saatte 38,09, 34,46, 34,66, 45,81, 12. saatte 42,41, 50,65, 54,21, 59,95, 24. saatte 31,92, 35,73, 38,78, 43,01  $\mu\text{mol/L}$  olarak bulundu.



**Grafik 5.** ML-I Verilen Tavşanlarda Gruplar Arası NO Değerleri

Grupların plazma NO düzeyleri kontrol grubuna göre kıyaslandığında; 1. saatte 0,5 ve 1 ng/kg ML-I verilen grupların NO düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı ( $p < 0,05$ ) gözlemlendi.



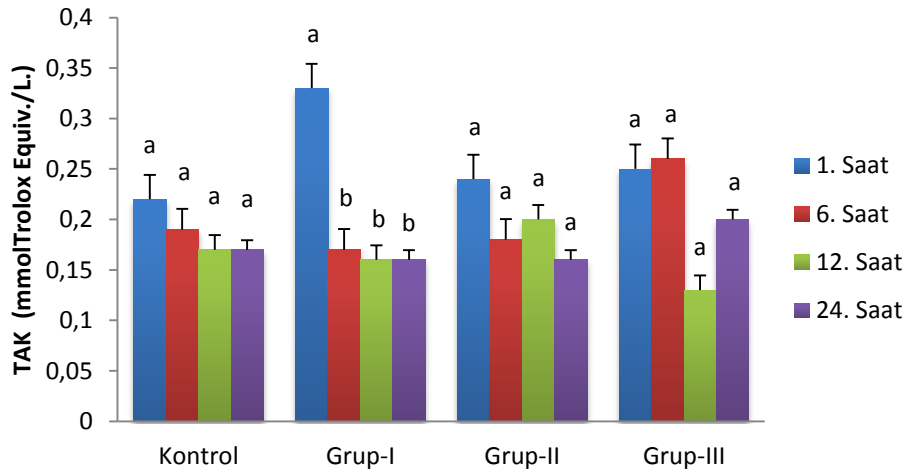


**Grafik 6.** ML-I Verilen Tavşanlarda Grup içi NO Değerleri

ML-I verilen grupların, grup içi NO düzeyleri saatlere göre kıyaslandığında; 1 ve 2 ng/kg ML-I verilen gruplarda 12. saatte istatistiksel olarak bir artış ( $p < 0,05$ ) gözlenirken, 0,5 ng/kg ML-I verilen grupta 12. saatte istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış belirlendi.

### 3. 3. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Düzeyleri

Kontrol ve deneme gruplarının plazma TAK düzeyleri sırasıyla 1. saatte 0,22, 0,33, 0,24, 0,25, 6. saatte 0,19, 0,17, 0,18, 0,26, 12. saatte 0,17, 0,16, 0,20, 0,13, 24. saatte 0,17, 0,16, 0,16, 0,20 mmol trolox equiv./L olarak bulundu.

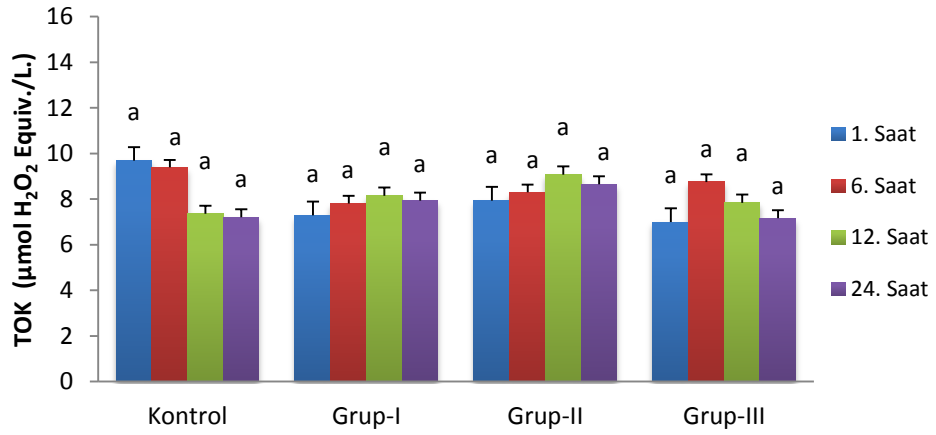


**Grafik 7.** ML-I Verilen Tavşanlarda Grup İçi TAK Değerleri

Çalışmada 0,5 ng/kg olacak şekilde ML-I verilen gruptan alınan numuneler saatlere göre mukayese edildiğinde, enjeksiyondan 1 saat sonra elde edilen değerlerin 6, 12 ve 24. saatlere göre istatistiksel olarak yüksek ( $p < 0,05$ ) olduğu, ML-I verilen grupların TAK düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 6, 12 ve 24. saatlerde alınan numunelerde istatistiksel olarak önemsiz değişimlerin olduğu saptandı.

### 3. 4. Total Oksidan Kapasite (TOK) Düzeyleri

Kontrol ve deneme gruplarının plazma TOK düzeyleri sırasıyla 1. saatte 9,68, 7,29, 7,93, 6,99, 6. saatte 9,38, 7,81, 8,29, 8,75, 12. saatte 7,35, 8,14, 9,06, 7,84, 24. saatte 7,19, 7,93, 8,64, 7,16 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv./L olarak bulundu.



**Grafik 8.** ML-I Verilen Tavşanlarda Grup İçi TOK Değerleri

Farklı dozlarda ML-I verilen grupların TOK düzeyleri saatlere ve kontrol grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak bir değişim gözlenmedi.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Geniş bir coğrafyada yetişen ökse otu, eski çağlardan beri halk hekimliğinde hipertansiyon, epilepsi, ateroskleroz, gut, depresyon, uyku bozuklukları, baş ağrısı, boğmaca, astım, diyare gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış, kanser araştırmalarında kullanımı ise 1917 yılında Rudolf Steiner tarafından gerçekleştirilmiştir (18).

Ökse otu ve preparatlarından elde edilen bir lektin olan ML-I'in (39), sitotoksik etkilere sahip olduğu, monositler/makrofajlar, granulositler ve NK hücrelerinin aktive olmasını sağlayarak, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırdığı ve bu yönden immünomodülatör etkisi olduğu bildirilmiştir (49, 52).

İmmün hastalıkların özellikle de kanserin tedavisinde kullanılabilmesi için ML-I'in toksik olmayan en etkin immünomodülatör dozunu belirlemek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* deneylerde farklı konsantrasyonlar çalışılmıştır. Örneğin; Beuth ve ark. (7) 0,5-5 ng/kg aralığındaki lektin konsantrasyonlarından en etkin dozun 1 ng/kg olduğunu, Hajto ve ark. (52), 0,5-3 ng ML-I/kg aralığında olumlu sonuçlar alındığını, Ribereau-Gayon ve ark. (95) ise hücre kültür ortamında TNF- $\alpha$  salınımının en yüksek olduğu lektin konsantrasyonunun 0,02 pg/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Bu amaçla, sitotoksik ve immünomodülatör etkisinin olduğu bildirilen ML-I'in farklı dozlarının tavşanlara intraperitoneal yolla verilmesiyle, TNF- $\alpha$ , NO, TAK ve TOK düzeylerine olan etkisi araştırıldı.

ML-I'in *in vivo* sitotoksik ve immünomodülatör etkilerine bakılan çalışmalar özellikle kanser hücreleri üzerine olan etkilerine yoğunlaşırken, *in vivo* olarak tümör gelişimini azalttığı, tavşanlarda ve ratlarda NK hücre aktivitesinde ve granüler lenfositlerin sayısında bir artışa neden olduğu kaydedilmiştir (7, 47, 50).

TNF- $\alpha$ , monosit/makrofaj, NK hücreleri, beyin mikrogial hücreleri ve karaciğerin kupffer hücreleri gibi farklı hücreler tarafından sentezlenen proinflamatuvar bir sitokin olup ( 85), ökse otu ekstraktlarındaki ML-I'in TNF- $\alpha$  üretimini uyardığı (74) bu lektinin uzaklaştırılması ile sulu ekstraktın immünomodülatör aktivitesini tamamen yitirdiği bildirilmiştir (8).

Yapılan bir çalışmada rat peritonundan elde edilen makrofaj kültür ortamının Kore ökse otunun sulu ekstraktının 10  $\mu$ g/ml dozu ile 24 saat inkübe edildiğinde, 30. dakikadan itibaren makrofajlardan TNF- $\alpha$  salınımının arttığı bildirilmiştir (123).

Yapılan çalışmada tavşanlara farklı dozlarda (0,5, 1 ve 2 ng/ml) ML-I verildi ve 1, 6, 12 ve 24. saatlerde alınan kan numunelerinde TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldı. 0,5 ng/kg ML-I verilen grupta TNF- $\alpha$  düzeyi bütün saatlerde kontrol grubuna göre yüksek ( $p < 0,01$ ) olmakla birlikte 1. saatte en yüksek değerine ulaştığı, diğer deneme gruplarında ise 12. saatte yüksek olduğu ( $p < 0,05$ ) gözlemlendi. TNF- $\alpha$  düzeyinin ML-I etkisiyle yükselmesinin yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla (11, 48, 49, 74, 90, 95) uyumlu olduğu ancak TNF- $\alpha$  salınımını etkileyen ML-I konsantrasyonlarında bir farklılık olduğu gözlemlendi.

Hajto ve ark.(48) sekiz kanserli hastaya 1ng/kg dozundaki ML-I'i i.v. olarak enjekte ettiklerinde bu hastaların kanlarında TNF- $\alpha$  düzeyinin 3. saatte en yüksek değerine ulaştığını görmüşlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarda (10, 66) kanserli hastaların TNF- $\alpha$  düzeylerinin normal bireylere göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışma ile Hajto ve ark. (48) yaptıkları çalışma arasındaki oluşan doz farkının lektin enjekte edilen kişilerin kanser olmasından kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.

ML-I'in immünomodülatör ve sitotoksik etkilerinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılan *in vitro* hücre kültürü denemelerinde lektin dozuna dair farklı konsantrasyonlar bildirilmiş, ML-I etkinliğinin, hücre serisi (16, 90, 111) ve kullanılan katkılara (90, 111), ortamın pirojen faktörlerle kontamine olup olmamasına (11) göre değişebildiği ileri sürülmüştür.

Hajto ve ark. (48), *in vitro* ortamda insan monositlerini 24 saat 0-0,5-1-10-50-100-500-1000 ng/ml ML-I ile inkübe edip, serum TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 düzeylerindeki değişiklikleri inceledikleri araştırmalarında; TNF- $\alpha$  düzeyinin kültür ortamında 10 ng/ml ML-I konsantrasyonunda en yüksek değerinde olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hajto ve ark. (49) yaptıkları başka bir çalışmada insan kanındaki monosit ve lenfositleri *in vitro* ortamda 24 saat farklı dozlardaki (1ng/ml-1 $\mu$ g/ml) ML-I ile inkübe etmişler ve hücreler için sitotoksik olmayan ML-I dozlarında (1 ve 10 ng/ml) IL-1 $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , IL -6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör ve IL-10 salınımında bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

İnsan monositlerinin *in vitro* ortamda 0,02-2000 pg/ml ML-I ile 18 saat inkübe edilmesi sonucu en yüksek TNF- $\alpha$  salınımının 0,02 pg/ml lektin konsantrasyonunda olduğu bildirilmiş, yüksek konsantrasyonlarda TNF- $\alpha$  salınımının azalmasının ise lektinin toksik etkisine ve/veya artan TNF- $\alpha$ 'nın hücreleri öldürebileceği nedenine bağlanmış ayrıca kültür ortamında sığır serumu kullanılmamasının çok düşük lektin konsantrasyonunda olumlu sonuç elde edilmesinin bir sebebi olabileceği ileri sürülmüştür (95).

Yapılan çalışmada TNF- $\alpha$  salınımını en fazla etkileyen 0,5 ng/kg'lık lektin dozunun Ribereau-Gayon ve ark. (95) yaptığı çalışmadaki lektin dozunun çok üzerinde olması lektinin *in vivo* ortamda bağlanabilecek daha fazla glikoligandın olduğu kanaatini oluşturdu, yine Timoshenko ve ark. (111) nötrofil kültür ortamına kan plazması eklediklerinde nötrofil agregasyonunda ve üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında azalma olmasının, ML-I'in kültür ortamındaki hücrelerden başka bağlanabilecek glikoligandlarında olduğunu ileri sürmeleri bu kanaati destekledi.

Yapılan *in vitro* çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, ML-I'in tavşanlara i.p. olarak verilmesiyle 0,5 ng/kg'lık dozun üstündeki lektin dozlarının özellikle monosit ve makrofajlar üzerinde sitotoksik etki yapmış olabileceği (95, 108) ayrıca lenfositlerinde bu konsantrasyonlardan etkilenebileceği (51) kanaatini oluşturdu.

Zararlı etkilerine karşın organizma serbest radikalleri gen ekspresyonu, apoptozisin uyarılması, doku oluşumu ve farklılaşması, enfeksiyonlarla mücadele (özellikle NO ve  $O_2^{\cdot-}$ ) gibi olaylarda kendi faydasına kullanabildiği (38),  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $NO^{\cdot}$  gibi reaktif oksijen türlerinin immün sistemdeki hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir yere sahip olduğu bildirilmektedir (39).

ML-I ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, insan hepatokarsinom hücrelerinde reaktif oksijen miktarını arttırarak bu hücrelerin apoptoza uğramasına yardımcı olduğu (62), nötrofillerden  $O_2^{\cdot-}$  (110) ve  $H_2O_2$  (111), makrofajlardan NO (59) salınımını uyardığı gösterilmiştir.

ML-I'in NO salınımı üzerine olan etkilerine bakılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, farelerde (112) ve RAW 264.7 makrofajlarda (59) NO salınımını uyardığı, SNP ile uyarılmış LLC-PK1 epitelyum hücrelerinde (61) ve LPS ile uyarılmış (67) RAW 264.7 makrofajlarında NO süpürücü aktivitesinin olduğu, dolayısıyla da NO üzerine düzenleyici rolünün olduğu ileri sürülmüştür.

Kim ve ark. (61) *in vitro* ortamda LLC-PK<sub>1</sub> böbrek epitel hücrelerinde sodyum nitroprüssid, pirogallol ve 3- morfolinosidnonimin ile oksidatif stres oluşturmuş ve Kore ökse otu lektininin 10-50-250-500 µg/ml dozundaki konsantrasyonlarının oksidatif stres üzerindeki etkilerine bakmışlardır. 500 µg/ml lektinin en etkin doz olduğunu, lektinin bu radikaller üzerinde iNOS, Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve NF-κB aktivitelerini inhibe ederek süpürücü etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kang ve ark. (59) kültür ortamında sıçan RAW 264.7 makrofaj hücrelerini farklı dozlarda ökse otu lektini ile 24 saat inkübe ettiklerinde 40 ng/ml lektin dozuna kadar iNOS aktivitesindeki artışa paralel olarak NO düzeyinde bir artış, bu dozun üzerinde lektinin sitotoksik etkisinden dolayı NO miktarında bir azalma olduğunu, ayrıca B zincirinin lektinin letal dozunun üzerindeki dozlarda bile doza bağlı olarak NO miktarını arttırmaya devam ettiğini gözlemlemişlerdir.

Yapılan çalışmada, 0,5 ve 1 ng/kg lektin dozlarının 1. saatte NO düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı ( $p<0,05$ ) 2 ng/kg lektin verilen grupta ise istatistiksel olarak bir değişimin olmadığı, daha sonra her üç lektin grubunda da grup içi NO miktarının zamanla arttığı, 12. saatte 1 ve 2 ng/kg lektin verilen grupların NO düzeyini 1 ve 6. saatlere göre arttırdığı ( $p<0,05$ ) gözlemlendi. Bütün gruplar arasında 12. saat ve sonrasında istatistiksel olarak bir değişimin olmadığı görüldü. 1. saatte NO miktarının 0,5 ve 1 ng/kg lektin verilen gruplarda azalması ML-I'in NO üzerine süpürücü etkisinden (61, 67) 2 ng/kg lektin verilen grupta ise istatistiksel olarak bir değişimin olmaması lektinin sitotoksik etkisinden (59), 1. saatten sonra lektin verilen gruplarda NO miktarının artması ve 12. saatte kontrol grubu ile aynı düzeye gelmesi B zincirinden (59) kaynaklanabileceği kanaatini oluşturdu.

Ökse otu ekstraktlarında antioksidan özelliğe fenolik bileşenlerin yanı sıra viskolektinlerin de katkıda bulunduğu (96), 42 µg/ml dozundaki lektinin DPPH'a karşı antioksidan özellik gösterdiği (61) ileri sürülmüştür.

Yapılan çalışmada 0,5 ng/kg lektin verilen grupta 1. saatte TAK seviyesinin diğer saatlere göre yüksek olması lektinin akut olarak antioksidan etki gösterdiği (61), 1. saatte TAK ile NO arasında önemli olmayan negatif korelasyonun ( $r= -0,674$   $p>0,05$ ) bulunması antioksidan sisteminde azalan NO miktarına etkisinin olabileceği, yine 6 ve 12. saatlerde TAK ile NO arasında negatif korelasyonların (sırasıyla  $r= -0,902$   $p<0,05$ ,  $r= -0,657$   $p>0,05$ ) oluşması artan NO miktarına lektinin B zincirinin katkıda bulunabileceği düşüncesini oluşturdu. Birinci saatte TAK ile NO arasında 1ng/kg lektin verilen grupta önemli olmayan negatif korelasyon ( $r= -0,561$   $p>0,05$ ), 2 ng/ kg lektin verilen grupta önemli olmayan pozitif korelasyon ( $r= 0,494$   $p>0,05$ ) oluşması, 1ng/kg lektin dozunun kısmen antioksidan etki ettiği, 2 ng/kg lektin dozunun böyle bir etkisinin olmadığı kanaatini oluşturdu.

Bazı sitokinlerin (IL-1, TNF, IF-γ) iNOS aktivitesini artırdığı (79, 82) bildirilse de çalışmada NO ve TNF-α düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmaması, NO düzeylerini ML-I'in özellikle de B zincirinin değiştirdiği düşüncesine neden oldu (59).



Serbest radikallerin oluşum hızları ile antioksidanların bunları etkisiz hale getirme hızı arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge hücreleri oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (23, 37).

Herbir oksidani ve antioksidanı ayrı ayrı ölçmek yerine numunedeki toplam oksidan ve antioksidan miktarını ölçmenin daha uygun olduğu, bu yüzden Erel'in geliştirdiği TAK ve TOK ölçme yönteminin kolay, hassas, güvenilir ve ucuz bir yöntem olduğu kaydedilmiştir (35, 36).

Daha çok kanser tedavisi ve araştırmalarında kullanılan ökse otu ekstraktlarının antioksidan özelliklerine yönelik *in vitro* (6, 86, 88, 96) ve *in vivo* (21, 84, 87, 102) çalışmalar yapılmış, *in vitro* çalışmalarda ökse otunun antioksidan özellik yönünden etken maddelerinin fenolik asit ve flavonoidler olduğu (86, 88), fenolik bileşenlerin yanı sıra viskolektinlerin de ökse otunun antioksidan özelliğine katkıda bulunduğu (96), antioksidan özelliğin üzerinde yetiştiği konakçının türüne, hasat zamanına (6) ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine (sulu, etanolik veya metanolik) göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (87).

Literatürde ökse otu bitkisinden elde edilen ekstraktların bazı oksidan ve antioksidan parametrelere olan etkisine bakılan çalışmaların (21, 68, 84, 87, 102) olmasına rağmen, ML-I'in *in vivo* olarak total antioksidan ve oksidan kapasite üzerine olan etkilerine bakılan çalışmalara rastlanmadı.

Yapılan çalışmada, ML-I'in TAK ve TOK düzeylerine önemli bir etkisinin olmadığı, sadece 0,5 ng/kg ML-I verilen grupta 1. saatteki TAK düzeyinin diğer saatlerdeki göre istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdiği, NO düzeyinin de azaldığı gözlemlendi. Düşük konsantrasyondaki ML-I'in akut olarak antioksidan etki gösterebileceği kanaatine varıldı.

Sonuç olarak 0,5 ng/kg dozundaki ML-I'in TNF- $\alpha$  ve NO düzeylerinde değişiklik meydana getirdiği, akut olarak antioksidan özellik gösterdiği gözlemlendi. Literatürdeki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde, ML-I'in etkin dozuna dair verilerin farklılıklar gösterdiği ve bu farklılıkların çeşitli etmenlerden (kullanılan hücre tipi, kültür ortamının katkıları vs) etkilendiği ileri

sürülmüştür. Gerek immün sistemin yapı ve işleyiş mekanizmasının gerekse ML-I in immün sistem üzerindeki etkilerine dair mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması ML-I ile ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği, *in vivo* olarak yapılan bu çalışmanın yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği sonucuna varıldı.

## 5. ÖZET

İmmünomodülatör ve sitotoksik özelliklerinin olduğu bildirilen ökse otu preparatları günümüzde özellikle kanser araştırmaları ve kanser tedavisinde destekleyici olarak kullanılmaktadır. Bu preparatlarda immünomodülatör ve sitotoksik etkiden sorumlu maddenin Mistletoe Lektin-I (ML-I) olduğu düşünölmektedir.

Çalışmada ML-I'in, farklı dozlarının tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nitrik oksit (NO), total antioksidan ve oksidan kapasite (TAK, TOK) düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlandı. 0,5 ng/kg ML-I verilen grupta TNF- $\alpha$  düzeyinin bütün saatlerde kontrol ve diğer lektin gruplarına göre yüksek olmakla birlikte 1. saatte en yüksek değerine ulaştığı ( $p < 0,01$ ), 0,5 ve 1 ng/kg lektin dozlarının 1. saatte NO düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı ( $p < 0,05$ ), 12. saatte ise 1 ve 2 ng/kg lektin dozlarının NO düzeyini arttırdığı ( $p < 0,05$ ) gruplar arasında istatistiksel olarak bir farkın oluşmadığı, yine 0,5 ng/kg ML-I verilen gruptan alınan numunelerde, 1 saat sonra elde edilen TAK değerlerinin 6, 12 ve 24. saatlere göre istatistiksel olarak yüksek ( $p < 0,05$ ) olduğu, TOK düzeyinin lektin verilen gruplarda istatistiksel olarak bir değişim göstermediği gözlemlendi.

Sonuç olarak 0,5 ng/kg dozundaki ML-I'in TNF- $\alpha$  ve NO düzeylerinde değişiklik meydana getirdiği, akut olarak antioksidan özellik gösterdiği gözlemlendi. Literatürdeki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde, ML-I'in etkin dozuna dair verilerin farklılıklar gösterdiği ve bu farklılıkların çeşitli etmenlerden (kullanılan hücre tipi, kültür ortamının katkıları vs) etkilendiği ileri sürölmüştür. Gerek immün sistemin yapı ve işleyiş mekanizmasının gerekse ML-I'in immün sistem üzerindeki etkilerine dair mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması ML-I ile ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği, *in vivo* olarak yapılan bu çalışmanın yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği kanaatini oluşturdu.

Anahtar Kelimeler: Mistletoe Lektin-I, Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ , Nitrik Oksit, Total Antioksidan ve Oksidan Kapasite

## 6. SUMMARY

Immunomodulatory and cytotoxic properties of mistletoe preparations are used today, especially in support of cancer research and in the treatment of cancer. Mistletoe Lectin-I (ML-I) in this preparations is thought to be the responsible agent for immunomodulatory and cytotoxic effects.

In this study, it was aimed to investigate the effect of different doses of ML-I on the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nitric oxide (NO), total antioxidant and oxidant capacity (TAC, TOC). TNF- $\alpha$  level in the group treated with ML-I (0.5 ng/kg) was higher than that of control and other lectin receiving groups at all hours, the highest value of TNF- $\alpha$  were reached at 1<sup>st</sup> hour ( $p < 0.01$ ). 0.5 and 1 ng/kg doses of lectin decreased NO level at 1<sup>st</sup> hour compared to control group ( $p < 0.05$ ), 1 and 2 ng/kg doses of lectin increased NO levels ( $p < 0.05$ ) at 12<sup>th</sup> hour, no statistically significant difference was found between the groups. In addition, TAC levels in samples obtained from the group given 0.5 ng/kg ML-I after 1 hour was statistically higher ( $p < 0.05$ ) than the samples taken at 6<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours. No statistically significant change was found in the level of TOC among lectin receiving groups.

In conclusion, ML-I at 0.5 ng/kg dose caused alterations in the levels of TNF- $\alpha$  and NO and showed an acute antioxidant effect. *In vivo* and *in vitro* studies show that, the effective dose of the ML-I shows variations and the differences in these doses could be due to many factors (cell type used in the culture, medium, additives, etc.). Because of the fact that both the structure and the functioning mechanism of the immune system as well as the mechanisms of the effects of ML-I on the immune system have not been fully clarified, it is expected that further studies should be done on the ML-I and in this sense this study carried out as *in vivo* can contribute to the further researchs.

Key Words: Mistletoe Lectin-I, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Nitric Oxide, Total Antioxidant and Oxidant Capacity

## 7. KAYNAKLAR

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.: Cellular and molecular immunology. Vol. 6. China. 2007.
2. Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W.J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., Harkins, R. N.: Human tumor necrosis factor production, purification, and characterization. J. Biol. Chem. 260:2345-2354. 1985.
3. Artigas, J., Bachler, B., Habedank, S., Taube, F., Franz, H., Niedobitek, F.: Comparative lectin histochemical studies on paraffin and glycol methacrylate-embedded CNS tissue specimen from AIDS autopsies. Zentralblatt für Pathol. 138:272-277. 1992.
4. Bachhav, S. S., Bhutada, M. S., Patil, S. D., Baser, B., Chaudhari, K. B.: Effect of *Viscum articulatum Burm.* (Loranthaceae) in N-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension and renal dysfunction. J. Ethnopharm. 142:467-473. 2012.
5. Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg S.: Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. Cancer Res. 59:2083-2090. 1999.
6. Barbasz, A., Kreczmer, B., Rudolphi-Skorska, E., Sieprawska, A., Woznica, D.: Content of antioxidant in extracts of mistletoe (*Viscum album L.*), yew (*Taxus baccata L.*), pine (*Pinus sylvestris L.*) and fir (*Abies alba Mill.*). herba polonica. 58:27-36. 2012.
7. Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H-J., Pulverer, G.: Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In vivo.* 5:29-32. 1991.
8. Beuth, J., Stoffel, B., Ko H. L., Jeljaszewicz, J., Pulverer, G.: Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract. Arzneimittel-Forschung:Drug Res. 45:1240-1242. 1995.

9. Beutler, B., Mahoney, J., Trang, L., Pekala, P., Cerami, A.: Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* 161:984-995. 1985.
10. Biberstein, S. E., Spiro, J. D., Lindquist, R., Kreutzer, D. L.: Enhanced tumor cell expression of tumor necrosis factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *American J. Surg.* 170:416-422. 1995.
11. Boneberg, E-M., Hartung, T.: Mistletoe lectin-I increases tumor necrosis factor- $\alpha$  release in lipopolysaccharide-stimulated whole blood via inhibition of interleukin-10 production. *J. Pharm. Exp. Therap.* 298 (3):996-1000. 2001.
12. Brooks, S. A., Leatham, A. J. C., Schumacher, U.: *Lectin Histochemistry*. BIOS Scientific Publishers. Oxford. 1997.
13. Bubenik, J.: Cytokine gene-modified vaccines in the therapy cancer. *Pharmacol. Ther.* 69:1-14. 1996.
14. Butler A., Nicholson R.: *Life, death and nitric oxide*. Cambridge. 2003.
15. Büssing A., Suzart K., Bergmann, J., Pfüller, U., Schietzel, M., Schweizer, K.: Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* 99:59-72. 1996.
16. Büssing, A., Suzart, K., Schweizer, K.: Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anticancer Drugs. Suppl.* 1:9-14. 1997.
17. Büssing A., Suzart K., Pfüller, U., Schietzel, M.: Induction of Fas ligand (CD95L) by the toxic mistletoe lectins in human lymphocytes. *Anticancer Res.* 19:1785-1790. 1999.
18. Büssing, A.: *Mistletoe; the genus Viscum*. Vol. 16. Hollanda. 2000
19. Büyükaşar, K.: Nitrik oksitin fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. *Seminer Özetleri*. Mersin. 2005.
20. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:3666-3670. 1975.

21. Cebovic, T., Popovic, M: Effects of different extracts of mistletoe leaves ( *Viscum album* L.) on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Tox. Lett.* (Abs.). 164:174. 2006.
22. Cross E. C., Halliwell B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M., Harman, D.: Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107:526-545. 1987.
23. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.: Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Tr. Nefrol. Diy. Transplant. Derg.* 3-4:92-95. 1997.
24. Davies M. G., Fulton G. J., Hagen P. O.: Clinical biology of nitric oxide. *Br. J. Surg.* 82:1598-1610. 1995.
25. Debray, H., Montreuil, J., Franz, H.: Fine sugar specificity of the mistletoe (*Viscum album*) lectin I. *Glycoconjugates J.* 6:550–557. 1994.
26. Delibaş, N., Özçankaya, R.: Serbest radikaller. Süleyman Demirel Üniv. Tıp Fak. Derg. 2:11-17. 1995.
27. Deliorman, D.: Ökse otu ve modern tıpta kullanımı. *Günc. Ecz. Derg.* 72:24-24-26. 1999.
28. Dodd R. B., Drickamer, K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology.* Oxford University Press. 11:71-79. 2001.
29. Doyle, C. A., Slater, P.: Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neurosci.* 76(2):387-395. 1997.
30. Dröge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95. 2002.
31. Eijan, A. M., Piccardo, I., Riveros, M. D., Sandes, E. O., Porcella, H., Jasnis, M. A., Sacerdote De Lustig, E., Malagrino, H., Pasik, L., Casabe, A. R.: Nitric oxide in patients with transitional bladder cancer. *J. Surg. Oncol.* 81:203-208. 2002.
32. Elstner, E. F.: Oxygen radicals-biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr.* 69:949-956. 1991.

33. Erbaş, D.: Nitrik oksit: özellikleri ve egzersizdeki rolü. Spor Bil. Derg. 13:33-39. 2002.
34. Erden, M.: Serbest radikaller. Tr. Klin. Tıp Bil. 12:201-207. 1992.
35. Erel, Ö.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin. Biochem. 37:277-285. 2004.
36. Erel, Ö.: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin. Biochem. 38: 1103-1111. 2005.
37. Evans, P., Halliwell, B.: Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br. J. Nutr. 85 (Suppl. 2):67-74. 2001.
38. Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S.: Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. Mutation Res. 567:1-61. 2004.
39. Finkel, T.: Oxygen radicals and signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 10:248-253. 1998.
40. Franz, H., Ziska, P., Kindt, A.: Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). Biochem. J. 195:481-484. 1981.
41. Franz, H.: Mistletoe lectins and their A and B chains. Oncol. 43:23-34. 1986.
42. Garthwaite, J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. Trends. Neuro Sci. 14:60-67. 1991.
43. Gillis, S., Williams, D. E.: Cytokine therapy: lessons learned and future challenges. Cur. Op. Immunol. 10:501-507. 1998.
44. Goetz, F. W., Planas, J. V., MacKenzie, S.: Tumor necrosis factor. Dev. Comp. Immunol. 28:487-497. 2004.
45. Grossarth-Matichek, R., Kiene, H., Baumgartner, S. M., Ziegler, R.: Use of iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: Prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. Altern. Ther. Health. Med. 7:57-58. 2001.
46. Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O.: Sitokinler. Tr. Klin. J. Med. Sci. 17:65-74. 1997.



47. Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H-J.: Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscaidor) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49:4803-4808. 1989.
48. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H-J.: Increased secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50:3322-3326. 1990.
49. Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J., Saller, R.: Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs.* 8 (Suppl 1):43-46. 1997.
50. Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs U., Lentzen, H., Saller, R.: Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Immunol.* 16:34-46. 1998.
51. Hajto, T., Hostanska, K., Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F., Nemeth, P.: Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. *eCAM.* 2:59-67. 2005.
52. Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J.: Immunomodulatory effect of a galactoside-specific mistletoe lectin. *Acta Histochem.* 111(Abs.):334. 2009.
53. Heiny, B. M., Beuth, J.: Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces beta-endorphin release and immunopotentialiation in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 14(3B):1339-1342. 1994.
54. Hinch, D. K., Pfüller, U., Schmitt, J. M.: The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness. *Planta.* 203:140-144. 1997.

55. Hopkins, S. J.: The pathophysiological role of cytokines. *Leg. Med.* 5:45-57. 2003.
56. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0731708506005115-gr2.jpg>
57. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-1856. 2005.
58. Huber, R., Barth, H., Schmitt-Graff, A., Klein, R.: Hypereosinophilia induced by high-dose intratumoral and peritumoral mistletoe application to a patient with pancreatic carcinoma. *J. Altern. Complement. Med.* 6:305-310. 2000.
59. Kang, T. B., Yoo, Y. C., Lee, K. H., Yoon, H. S., Her, E., Kim, J-B, Song, S. K.: Korean mistletoe lectin (KML-IIU) and its subchains induce nitric oxide (NO) production in murine macrophage cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 15:197-204. 2008.
60. Kılınc, K., Kılınc, A.: Oksijen toksitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Üniv. Tıp Derg.* 33:110-118. 2002.
61. Kim, B. K., Choi, M. J., Park, K. Y., Cho, E. J.: Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stres. *Biol. Pharm. Bull.* 33(7):1152-1158. 2010.
62. Kim, W-H., Park, W. B., Gao, B., Jung, M. H.: Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 66:1383-1396. 2004.
63. Kim, Y. M., Bombeck, C. A., Billiar, T. R.: Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ. Res.* 84:253-256. 1999.
64. Klett, C. Y., Anderer, F. A.: Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from *Viscum album* extract. *Arzneimittelforschung.* 39:1580-1585. 1989.
65. Kovacs, E.: The *in vitro* effect of *Viscum album* (VA) extract on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients. *Phytother. Res.* 16:143-147. 2002.
66. Kurokawa, H., Takeda, S., Yamashita, Y., Nakamura, T., Murata, T., Takahashi, T., Fukuyama, H., Zhang, M., Ishibashi, H.: Estimation of

- Serum tumour necrosis factor- $\alpha$  and correlation to tumour markers in patients with oral squamous cell carcinoma. *Asian J. Oral Maxillofac. Surg.*14:148-154. 2002.
- 67.Lee, J. Y., Kim, J. Y., Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, B. H., Rhee, M. H., Lee, A., Kwon M., Hong, S., Cho, J. Y.: *In vitro* immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30:2043-2051. 2007.
- 68.Leu, Y-L., Hwang, T-L., Chung, Y. M., Hong, P. Y.: The Inhibition of superoxide anion generation in human neutrophils by *Viscum coloratum*. *Chem. Pharmacol. Bull.* 54(7):1063-1066. 2006.
- 69.Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., Snyder, S. H.: Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120:227-37.1994. in: Türköz Y, Özerol E.: Nitrik Oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *J. Turgut Özal Med. Cent.* 4(4):453-461. 1997.
- 70.Luther, P., Sehart, I., Bergmann, K. C., Reutgen, H.: Allergy and lectins: action between IgE-mediated histamine release and glycoproteins from *Viscum album L.* (mistletoe). *Acta Biol. Med.Ger.* 37:1623-1628. 1978.
- 71.Lutsch, G., Noll, F., Ziska, P., Kindt, A., Franz, H.: Electron microscopic investigations on the structure of lectin from *Viscum album L.* *FEBS Lett.* 170:335-338. 1984.
- 72.Lyu, S. Y., Choi, S. H., Park, W. B.: Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch. Pharm. Res.* 25:93-101. 2002.
- 73.MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C.: Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350. 1997.
- 74.Mannel, D. N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A., Franz, H.: Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol. Immunotherapy.* 33:177-182. 1991.
- 75.Marsden, P. A., Brenner, M. B.: Nitric oxide and endothelins: Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Semin Nephrol.*11:169-185. 1991.

76. Meager, A.: Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application. *Methods*. 38:237-252. 2006.
77. Millar, T. M., Kanczler, J. M., Bodamyali, T., Stevens, C., Blake, D.: Nitric oxide. its generation, reactions and role in physiology. in: Tomasi, A., Özben, T. Skulachev, V. P. (Eds.): Free radicals, nitric oxide and inflammation: Molecular, biochemical and clinical aspects. IOS Press. 2003.
78. Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A.: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 5:62-71. 2001.
79. Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A.: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-141. 1991.
80. Moncada, S.: Nitric oxide: Discovery and impact on clinical medicine. *J. Royal Society Med.* 92:164-169. 1999.
81. Nakane, M., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Förstermann, U., Murad, F.: Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316:175-180. 1993.
82. Nathan, C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB*. 6:3051-3064. 1992.
83. Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F., Levrero, M.: Apoptotic, non-apoptotic and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem. Pharmacol.* 56:915-920. 1998.
84. Nwanjo, H. U.: Free radical scavenging potential of the aqueous extract of *Viscum album* (Mistletoe) leaves in diabetic Wistar rats hepatocytes. *Internet J. Nutr. Wellness*. 3(2). Available online. 2007.
85. Odeh, M.: The role of tumour necrosis factor- $\alpha$  in acquired immunodeficiency syndrome. *J. Int. Med.* 228:549-556. 1990.
86. Oluwaseun, A. A., Ganiyu, O.: Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *African J. Biotechnol.* 7:3138-3142. 2008.
87. Orhan, D. D., Aslan, M., Şendoğdu, N., Ergun, F., Yeşilada, E.: Evaluation of hypoglycemic effect and antioxidant activity of three

- Viscum album* subspecies (European mistletoe) in streptozotocin-diabetic rats. J. Ethnopharm. 98:95-102. 2005.
88. Papuc, C., Crivineanu, M., Goran, G., Nicorescu, V., Durdun, N.: Free radicals scavenging and antioxidant activity of European mistletoe (*Viscum album*) and European birthwort (*Aristolochia clematitis*). Rev. Chim. 61:619-622. 2010.
89. Parameswaran, N., Patial, S.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. 20:87-103. 2010.
90. Park, J. H., Hyun, C. K., Shin, H. K.: Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe. Cancer Lett. 139:207-213. 1999.
91. Pietrzak, A. T., Zalewska, A., Chodorowska, G., Krasowska, D., Michalak-Stoma, A., Nockowski, P., Osemlak, P., Paszkowski, T., Rolinski, J.M.: Cytokines and anticytokines in psoriasis. Clin. Chim. Act. 394:7-21. 2008.
92. Porasuphatana, S., Tsai, P., Rosen, G. M.: The generation of free radicals by nitric oxide synthase. Comp. Biochem. Physiol. 134:281-289. 2003.
93. Radomski, M., Moncada, S.: Modulation of platelet aggregation by an L-arginine- nitric oxide pathway. Trends. Pharmzacol. Sci. 12:87-88. 1991.
94. Rhodes, M. J., Milton, J. D.: Lectin Methods and Protocols. Humana Pres. Totowa. 2004.
95. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P., Anton, R.: Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. Cancer Lett. 109:33-38. 1996.
96. Roman, G. P., Neagu, E., Radu, G. L.: Antiradical activities of *Salvia officinalis* and *Viscum album* L. extracts concentrated by ultrafiltration process. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 8:47-58. 2009.
97. Samtleben, R., Kiefer, M., Luther, P.: Characterization of the different lectins from *Viscum album* (mistletoe) and their structural relationships with the agglutinins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*,

1985. in: Wagner H. (ed.). Immunomodulatory Agents from Plants. Birkhauser. Berlin. 1999.
98. Sandes, E. O., Faletti, A. G., Riveros, M. D., Vidal Mdel, C., Gimenez, L., Casabe, A. R., Eijan, A. M.: Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric Oxide*. 12:39-45. 2005.
99. Schoffski, P., Breidenbach, I., Krauter, J., Bolte, O., Stadler, M., Ganser, A., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H.: Weekly 24 h. infusion of aviscumine (rViscumine): A phase I study in patients with solid tumours. *Eur. J. Cancer*. 41:1431-1438. 2005.
100. Schumacher, U., Adam, E., Kretzschmar, H., Pfüller, U.: Binding of mistletoe lectins I, II and III to microglia and Alzheimer plaque glycoproteins in human brains. *Acta Histochem*. 96:399-403. 1994.
101. Sharon, N.: Lectins: Carbohydrate-specific reagent and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem*. 282:2753-2764. 2006.
102. Shi, Z-M., Feng, P., Jiang, D. Q., Wang, X. J.: Mistletoe alkali inhibits peroxidation in rat liver and kidney. *World J. Gastroenterol*. 12(25):4052-4055. 2006.
103. Soler, M. H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T., Voelter, W.: Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. *FEBS Lett*. 399:153-157. 1996.
104. Soler, M. H., Stoeva, S., Voelter, W.: Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 246:596-601. 1998.
105. Stein, G. M., Schaller, G., Pfüller, U., Schietzel, M., Büssing, A.: Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res*. 19:1037-1042. 1999.
106. Steuer-Vogt M. K., Bonkowsky, V., Ambrosch, P., Scholz, M., Neiss, A., Strutz, J., Hennig, M., Lenarz, T., Arnold, W.: The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: A randomised controlled clinical trial. *Eur. J. Cancer* 37: 23-31. 2001.

107. Stirpe, F., Legg, R. F., Onyon, L. J., Ziska, P., Franz, H.: Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album L.* (mistletoe). *Biochem. J.* 190:843-845. 1980.
108. Sung, N-Y, Byun, E-B., Song, D-S., Jin, Y-B., Kim, J-K., Park, J-H., Song, B-S., Jung, P-M., Byunc, M-W., Lee, J-W., Park, S-H., Kim, J-H.: Effect of gamma irradiation on mistletoe (*Viscum album*) lectin-mediated toxicity and immunomodulatory activity. *FEBS Open Bio.* 3:106-111. 2013.
109. Symons, M. C. R.: Inorganic radicals of relevance to biological systems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 311: 451-472. 1985.
110. Timoshenko, A. V., Gabius H-J.: Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside galactoside specific lectin from *Viscum album*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 374:237-43. 1993.
111. Timoshenko, A. V., Cherenkevich, S. N., Gabius, H-J.: *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and lectin effect on neutrophil. *Biomed. Pharmacol.* 49:153-158. 1995.
112. Timoshenko, A. V., Lan, Y., Gabius, H-J, Lala, P. K.: Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination: effects on tumor growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. *Eur. J. Cancer.* 37:1910-1920. 2001.
113. Türköz, Y., Özerol, E.: Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Turgut Özal Tıp Merk. Derg.* 4:453-461. 1997.
114. Urso, M. L., Clarkson, P. M.: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189:41-54. 2003.
115. Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Clin. Biol.* 39:44-84. 2007.
116. Van Damme, E. J. M, Peumans, W. J., Barre, A., Rouge, P.: Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. P. Sci.* 17:575-692. 1998.

117. Voelter, W., Wacker, R., Stanka, S., Tsitsilonis, R., Betzel, C.: Mistletoe lectins, structure and function. 149-151. in: Rahman, A., Choudhary, M. I., Khan, K. M. (Eds.): *Frontiers in Natural Product Chemistry*. Vol 1. Bentham Sci. Publishers Ltd. 2005.
118. WHO Pharmaceuticals Newsletter, 7 and 8, 1997. In: Hutt N., Kopferschmitt-Kubler M.C., Cabalion J., Purohit, A., Alt, M., Pauli, G.: Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe (*Viscum album L.*). *Allergol et Immunopathol.* 29(5):201-203. 2001.
119. Willson, R. L., Dunster, L. G., Forni, L. G., Gee, C. A., Kittridge, K. J.: Organic free radicals and proteins in biochemical injury: Electron or hydrogen-transfer reactions?. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 311:545-563. 1985.
120. Wink, D. A., Mitchell, J. B.: Chemical biology of nitric oxide: Insight into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25:434-456. 1998.
121. Wu, A. M., Lisowska, E., Duk, M., Yang, Z.: Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj. J.* 26(8):899-913. 2009.
122. Yeşilada, E.: Makrofaj ve lenfosit kaynaklı sitokin çalışmalarının halk ilaçlarının biyolojik etki değerlendirmesinde rolü. XIV. Bitkisel ilaç hammadeleri toplantısı. Eskişehir. 2002.
123. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Choi, O. B., Do, M. S., Kang, T. B., Lee, S. W., Azuma, I., Kim, J. B.: Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *Cancer Lett.* 97:83-91. 1995.
124. Yoshida, T., Zhang, M., Chen, C., Franz, H., Wu, H. C.: Enhancement of the cytotoxicity of mistletoe lectin-1 (ML-1) by high pH or perturbation in Golgi functions. *Pharmazie.* 46:349-351. 1991.
125. Youle, R. J., Neville, D. M.: Kinetics of protein synthesis inactivation by Ricin-Anti-Thy 1.1 monoclonal antibody hybrids. *Biol. Chem.* 257:1598-1601. 1982.
126. Ziska, P., Eifler, R., Franz, H.: Chemical modification studies on the D-galactopyranosyl binding lectin from the mistletoe *Viscum album L.*,



Acta Biol. Med. Ger. 38(9):1361-1363. 1979. in: Ergun F., Deliorman D., Şener B., *Viscum album* L. Lektinleri. FABAD J. Pharmacol. Sci. 20:117-123. 1995.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Kars'ta doğdu. İlköğrenimini Fevzi Paşa İlkokulu'nda, ortaöğrenimini Gazi Kars Ortaokulu ve Alpaslan Lisesi'nde tamamladı. Lisans Eğitimini 1997-2001 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği'nde, Yüksek Lisans eğitimini 2003-2005 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladıktan sonra 2010 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı.