

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**SIÇANLARDA KARBON TETRAKLORÜR İLE OLUŞTURULAN  
KARACİĞER HASARINA AMARANTHUS LİVİDUS (A. BLİTUM)  
BİTKİSİNİN ANTİOKSİDAN VE HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**TUĞBA YILMAZ**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. AYŞE CAN**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2010**

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

14 / 09 / 2010

  
 Prof. Dr. Tamer Demiralp  
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Biyokimya  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Biyokimya  
 Tez Sahibi : Tuğba YILMAZ  
 Tez Başlığı : Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına  
 Amaranthus lividus (A. blitum) Bitkisinin Antioksidan ve Hepatoprotektif  
 Etkilerinin İncelenmesi  
 Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
 Sınav Tarihi : 08 / 07 / 2010


### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı \_\_\_\_\_

1. Prof. Dr. Müjdat UYSAL İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 
2. Prof. Dr. Ayşe CAN (Tez Danışmanı) İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 
3. Prof. Dr. Nuriye AKEV (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 
4. Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı 
5. Prof. Dr. Hakan BERKKAN İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Tuğba Yılmaz

## İTHAF

*Tezimi, yokluđunu her an hissettiğim canım ablam Dilek Müftiođlu'na ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Tezimin konusunu veren, tez çalışmalarımı özenle yöneten, tez çalışmam için gerekli bitki materyalini sağlayan ve karşılaştığım güçlüklerin giderilmesinde yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe Can'a,

Doktora eğitimim süresince gerekli olanakları sağlayan ve desteklerini her zaman hissettiğim İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nuriye Akev'e ve Biokimya Anabilim Dalı eski Başkanı İstanbul Bilim Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Hakan Berkkan'a,

Tez çalışmalarım süresince her aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Müjdat Uysal, Mühendislik Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Refiye Yanardağ ve Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Nurten Özsoy'a,

Tezimin deneysel çalışmaları sırasında laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül Baktır ve Genel Kimya Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Ufuk Kolak'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımları için Yrd.Doç.Dr. Alper Okyar, Arş.Gör.Dr. Zeliha Pala Kara, Arş.Gör.Dr. Özlem Kurt ve Arş.Gör. Mehmet Boğa'ya,

En zor zamanlarımı benimle paylaşan iyimserliği, neşesi ve dostluğuyla bana her zaman güç veren sevgili arkadaşım Arş.Gör.Mine Koçyiğit'e,

Her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan Zeki Özden'e,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora tezim süresince de her konuda bana sonsuz destek olan ve sevgileriyle yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1484

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİİ
ÖZET .....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Reaktif Oksijen Türleri .....	4
2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı.....	7
2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri .....	11
2.2. Antioksidanlar .....	15
2.2.1. Koruyucu Antioksidan Savunma Sistemleri .....	16
2.2.2. Tutucu (Süpürücü) Antioksidan Savunma Sistemleri.....	16
2.2.3. Tamir Mekanizmaları.....	21
2.3. Oksidatif Stres.....	21
2.4. Karaciğerin Anatomik ve Histolojik Yapısı .....	24
2.4.1. Karaciğerin Görevleri .....	26
2.4.2. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	27
2.5. Karbon Tetraklorür (CCl <sub>4</sub> ).....	28
2.6. Silimarin ve Genel Özellikleri .....	33
2.6.1. Silimarinin Farmakolojik Etkileri .....	34
2.7. <i>Amaranthus</i> ve Genel Özellikleri.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	41
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	43

3.3. Kullanılan Deneysel Hayvanlar ve Oluşturulan Gruplar .....	44
3.4. Deneysel Protokolün Uygulanması .....	44
3.4.1. Bitki Materyali .....	44
3.4.2. <i>Amaranthus lividus</i> Sulu Ekstresinin Hazırlanması .....	45
3.4.3. Karaciğer Hasarı Oluşturulması .....	45
3.4.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması .....	46
3.4.5. Karaciğer Doku Homojenatının Hazırlanması .....	46
3.5. Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri .....	47
3.5.1. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin Tayini .....	47
3.5.2. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin Tayini .....	49
3.5.3. Serumda Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Tayini .....	51
3.5.4. Serumda Total Bilirubin Miktarının Tayini .....	52
3.5.5. Serumda Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin Tayini .....	53
3.5.6. Serumda Paraoksonaz (PON) Aktivitesinin Tayini .....	54
3.5.7. Karaciğerde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Tayini .....	55
3.5.8. Karaciğerde Glutasyon (GSH) Miktarının Tayini .....	55
3.5.9. Karaciğerde Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini .....	56
3.5.10. Karaciğerde Glutasyon-S-transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini .....	57
3.5.11. Karaciğerde Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Tayini .....	58
3.5.12. Karaciğerde Glutasyon Redüktaz (GSH-R) Aktivitesinin Tayini .....	60
3.5.13. Karaciğerde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini .....	61
3.5.14. Karaciğerde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini .....	62
3.5.15. Karaciğerde Protein Miktarının Tayini .....	64
3.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler .....	65
4. BULGULAR .....	66
4.1. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin İncelenmesi .....	66
4.2. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin İncelenmesi .....	67
4.3. Serumda Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin İncelenmesi .....	68
4.4. Serumda Total Bilirubin Miktarının İncelenmesi .....	69
4.5. Serumda Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin İncelenmesi .....	70
4.6. Serumda Paraoksonaz (PON) Aktivitesinin İncelenmesi .....	71
4.7. Karaciğerde Lipit Peroksidasyonu (LPO)'nun İncelenmesi .....	72
4.8. Karaciğerde Glutasyon (GSH) Miktarının İncelenmesi .....	73

4.9. Karaciğerde Katalaz (CAT) Aktivitesinin İncelenmesi.....	74
4.10. Karaciğerde Glutasyon-S-transferaz (GST) Aktivitesinin İncelenmesi.....	75
4.11. Karaciğerde Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin İncelenmesi.....	76
4.12. Karaciğerde Glutasyon Redüktaz (GSH-R) Aktivitesinin İncelenmesi.....	77
4.13. Karaciğerde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin İncelenmesi.....	78
4.14. Karaciğerde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin İncelenmesi.....	79
5. TARTIŞMA.....	80
KAYNAKLAR.....	84
ETİK KURUL KARARI.....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
ÖZGEÇMİŞ.....	98

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler.....	5
Tablo 2-2: Moleküler oksijenin farklı formlarının en dış orbitaldeki elektronlarının konfigürasyonu .....	6
Tablo 2-3: Hücrelerdeki ROT kaynakları .....	9
Tablo 2-4: Serbest radikallerin hücre bileşenlerinde oluşturduğu zararlı etkiler.....	11
Tablo 2-5: Antioksidan savunma sistemleri .....	16
Tablo 2-6: Serbest radikaller ile ilişkili bazı patolojik durumlar .....	22
Tablo 2-7: Karaciğer fonksiyon testleri .....	27
Tablo 4-1: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesine etkisi .....	66
Tablo 4-2: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesine etkisi .....	67
Tablo 4-3: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alkalen fosfataz (ALP) aktivitesine etkisi .....	68
Tablo 4-4: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum bilirubin düzeyine etkisi .....	69
Tablo 4-5: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum arilesteraz (ARE) aktivitesine etkisi .....	70
Tablo 4-6: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum paraoksonaz (PON) aktivitesine etkisi.....	71
Tablo 4-7: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer lipid peroksidasyonu düzeyine etkisi .....	72
Tablo 4-8: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon (GSH) düzeyine etkisi.....	73
Tablo 4-9: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer katalaz (CAT) düzeyine etkisi .....	74
Tablo 4-10: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkisi .....	75
Tablo 4-11: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesine etkisi.....	76

Tablo 4-12: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon redüktaz (GSH-R) aktivitesine etkisi.....	77
Tablo 4-13: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi.....	78
Tablo 4-14: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine etkisi.....	79

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları .....	8
Şekil 2-2: Aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimi .....	10
Şekil 2-3: Mitokondriyal elektron transport zinciri ve elektron kaçağı .....	11
Şekil 2-4: Lipit peroksidasyonu .....	13
Şekil 2-5: ROT'nin DNA üzerine etkisi .....	14
Şekil 2-6: Hücredeki antioksidan savunma sistemleri .....	15
Şekil 2-7: Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunlara karşı savunma mekanizmaları .....	21
Şekil 2-8: Oksidatif/nitrozatif stresle ilgili belirteçler .....	23
Şekil 2-9: Karaciğerin anatomik (a) ve histolojik yapısı (b). .....	25
Şekil 2-10: CCl <sub>4</sub> 'ün metabolizması .....	30
Şekil 2-11: CCl <sub>4</sub> ile oluşan karaciğer hasarının mekanizması .....	32
Şekil 2-12: Silimarin kompleksinde bulunan flavonolignanlar. ....	33
Şekil 2-13: <i>Amaranthus lividus</i> L. ....	40
Şekil 4-1: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesine etkisi. ....	66
Şekil 4-2: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesine etkisi. ....	67
Şekil 4-3: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alkalin fosfataz (ALP) aktivitesine etkisi. ....	68
Şekil 4-4: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum bilirubin düzeyine etkisi. ....	69
Şekil 4-5: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum arilesteraz (ARE) aktivitesine etkisi.....	70
Şekil 4-6: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda serum paraoksonaz (PON) aktivitesine etkisi.....	71
Şekil 4-7: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer lipit peroksidasyonu düzeyine etkisi. ....	72
Şekil 4-8: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon (GSH) düzeyine etkisi.....	73

Şekil 4-9: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer katalaz (CAT) aktivitesine etkisi.....	74
Şekil 4-10: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkisi. ....	75
Şekil 4-11: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesine etkisi.....	76
Şekil 4-12: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda karaciğer glutatyon redüktaz (GSH-R) aktivitesine etkisi.....	77
Şekil 4-13: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi.....	78
Şekil 4-14: <i>A. lividus</i> ekstresi ve silimarinin, CCl <sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine etkisi.....	79

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-dezoksiguanozin
AGE'ler	: İlerlemiş glikasyon son ürünleri
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
ARE	: Aril esteraz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BSA	: Sığır serum albumin
CAT	: Katalaz
$\text{CCl}_3^\bullet$	: Triklorometil radikali
$\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$	: Triklorometilperoksi radikali
$\text{CCl}_4$	: Karbon tetraklorür
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CMC	: Karboksimetilselüloz
CoQ	: Koenzim Q
CYP	: Sitokrom P450
DTNB	: 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
EDTA	: Etilendiamintetra-asetik asit
GSH	: Glutatyon indirgenmiş
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH-R	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Glutatyon yükseltgenmiş

GST	: Glutatyon-S-transferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High density lipoprotein)
HTAB	: Heksa-desiltrimetilamonyum bromid
L•	: Lipit radikali
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)
LO•	: Alkoksil radikali
LOO•	: Peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NAD <sup>+</sup>	: β-Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş)
NADH	: β-Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
NADP <sup>+</sup>	: β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş)
NADPH	: β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O <sub>2</sub> •	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit
pNPA	: p-Nitrofenil asetat
pNPP	: p-Nitrofenil fosfat

PON	: Paraoksonaz
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi (Polyunsaturated fatty acid)
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RS <sup>•</sup>	: Tiyil radikali
SAM	: S-adenozil metiyonin
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TNF- $\alpha$	: Tümör nekrozis faktör $\alpha$
$\gamma$ -GGT	: $\gamma$ -Glutamil transferaz

## ÖZET

Yılmaz, T. (2010). Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına *Amaranthus lividus* (*A. blitum*) Bitkisinin Antioksidan ve Hepatoprotektif Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul.

Bitkiler, karaciğer bozukluklarının tedavisi için geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılırlar. Dolayısıyla karaciğer hasarının tedavisinde uygulanacak yeni ajanlar için potansiyel kaynak olarak kullanılabilirler. *Amaranthus* türleri tüm dünyada yaygın olarak yetişir ve bir çok ülkede tahıl ve sebze olarak kullanılır. *Amaranthus lividus* L. (*Amaranthaceae*) Batı Karadeniz Bölgesinde yiyecek olarak tüketilen önemli bir bitkidir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda karbon tetraklorürün oluşturduğu karaciğer toksisitesine *A. lividus* sulu ekstresinin antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda sıçanlara tek doz karbon tetraklorür (zeytin yağı ile 1:1 oranında seyreltilmiş 1,5 mL/kg i.p.) uygulamasından önce 9 gün boyunca *A. lividus* (250 ve 500 mg/kg) verildi. Bütün sıçanlar karbon tetraklorür uygulamasından 24 saat sonra öldürüldü. Kan örnekleri alındı ve elde edilen serumlarda alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), aril estراز (ARE) ve paraoksonaz (PON) aktiviteleri ve total bilirubin düzeyi ölçüldü. Karaciğerde malondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) düzeyleri, katalaz (CAT), glutasyon transferaz (GST), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon redüktaz (GSH-R) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim aktiviteleri ve ayrıca miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçüldü. Deneylerimiz sonucunda, *A. lividus* ön uygulamasının karbon tetraklorür verilmesi sonucunda artan ALT, AST ve MPO aktivitelerini anlamlı derecede azalttığını, MDA ve bilirubin düzeylerindeki artışı ve karaciğerde GSH azalışını önlediğini gösterdi. Bu değişikliklere paralel olarak *A. lividus*, karbon tetraklorür uygulanan sıçanlarla karşılaştırıldığında, antioksidan enzim aktivitelerini (CAT, GST, GSH-Px, GSH-R ve SOD) anlamlı derecede arttırdı. *A. lividus* uygulaması PON ve ARE aktivitelerinde anlamlı olmayan artışa neden oldu. Karbon tetraklorür uygulanması ile serum ALP düzeyinde bir değişiklik gözlenmedi. Sonuçlarımız sıçanlarda karbon tetraklorürün oluşturduğu hepatotoksositeye karşı *A. lividus*'un koruyucu etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin bitkinin antioksidan aktivitesinden ileri gelebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus lividus* L., antioksidan aktivite, hepatoprotektif etki, silimarin, karbon tetraklorür toksisitesi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1484

## ABSTRACT

Yılmaz, T. (2010). Investigation of Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Amaranthus lividus* (*A. blitum*) Against Carbon Tetrachloride-Induce Liver Injury in Rats. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry Doctorate Thesis, Istanbul.

Plants used in traditional medicine for the treatment of liver disorders are of great interest, as they may serve as potential sources for new therapeutic agents that could be applied in the management and prevention of hepatic injuries. *Amaranthus* species are widely distributed throughout the world and they are able to produce grains and leafy vegetables. *Amaranthus lividus* L. (*Amaranthaceae*) is consumed as popular vegetable in West Black Sea Region of Turkey. The objective of the present study was to investigate the antioxidant and hepatoprotective effects of water extract of *A. lividus* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. Rats were pretreated with *A. lividus* extract (250 and 500 mg/kg p.o.) for 9 days before treatment with a single dose of carbon tetrachloride (1,5 mL/kg 1:1 in olive oil i.p.). All rats were sacrificed 24h after the carbon tetrachloride injection. Blood samples were collected for assaying serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), aryl esterase (ARE) and paraoxonase (PON) activities and total bilirubin level. The liver was removed for evaluating malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, myeloperoxidase (MPO) activities, as well as the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-R) and superoxide dismutase (SOD). Our results demonstrated that pretreatment of rats with *A. lividus*, significantly reduced the substantially increased activities of AST, ALT and MPO, prevented the elevation of MDA and bilirubin levels, as well as protected the liver from GSH depletion. Parallel to these changes, *A. lividus* significantly increased antioxidant enzyme activities (CAT, GST, GSH-Px, GSH-R and SOD) compared with carbon tetrachloride treated rats. The PON and ARE activities were slightly elevated in rats which have received pretreatment of *A. lividus*. Moreover ALP activities remained unchanged following carbon tetrachloride treatment. The results indicated that *A. lividus* has a protective effect against carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in rats, and this effect might be related to antioxidant activity of the plant.

Key Words: *Amaranthus lividus* L., antioxidant activity, hepatoprotective effect, silymarin, carbon tetrachloride toxicity

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 1484

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oksijenin metabolize edildiği canlılarda, önemli derişim ve çeşitlilikte radikal üretimi gerçekleşir. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan bu bileşikler, süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet}$ ) veya hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) gibi oksijen merkezli radikallerin yanında, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hipoklorik asit ( $HOCl$ ) gibi non-radikal türleri de kapsar. Azottan oluşan reaktif nitrojen türleri (RNT)'nin en önemlisi nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ )'tir (Auroma 1998; Mügge 1998; Valko ve ark. 2006). Bu radikaller radyasyon, UV ışık, hava kirliliği ve bazı ilaçlar gibi çeşitli dış etkenlerle veya mitokondrideki elektron transport sistemlerinde, birçok enzimin katalizlediği reaksiyonlarda ve aktive olmuş nötrofillerde olduğu gibi hücredeki normal metabolik olaylar sırasında da oluşmaktadır (Southorn ve Powis 1988; Mügge 1998; Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006). ROT hücrelerin lipit, protein, DNA ve karbohidratlar gibi tüm hücrenel bileşenlerine etki eder; membranlarda lipit peroksidasyonunu başlatarak hücre hasarına neden olur, proteinlerin üç boyutlu yapılarında değişikliklere, agregasyon veya çapraz bağlı proteinlerin oluşumuna sebep olarak protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açar ve DNA ile etkileşimi zincir kırılmaları, nükleotid kaymaları, pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve DNA denatürasyonu gibi çeşitli olaylara neden olur (Southorn ve Powis 1988; Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Hücreler ROT'nin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önleyen antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Enzim yapısında olan antioksidanlar arasında en önemlileri süperoksit radikalini  $H_2O_2$  ve  $H_2O$ 'ya dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px),  $H_2O_2$ 'i suya indirgeyen katalazdır (CAT). Ayrıca glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidazın indirgediği reaksiyonlarda oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) haline getirilmesini ve glutatyon-S-transferaz (GST) ise karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif bileşiklere dönüşümünü kataliz eder. Membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan E vitamini ve güçlü indirgeyici özelliğe sahip olan C vitamini diğer hücrenel antioksidan savunma sistemleridir. Glutatyon ise yapısındaki sülfidril grubu sayesinde çok önemli bir antioksidandır ve ayrıca GSH-Px ve GST gibi

antioksidan enzimlerin de kofaktörüdür (Southorn ve Powis 1988; Sies 1997; Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999; Matés ve ark. 1999; Valko ve ark. 2006).

Organizmada serbest radikallerin oluşumu ve bunların antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılması bir denge halindedir. Bu dengenin bozulması oksidatif stres olarak adlandırılan durumun ortaya çıkmasına neden olur. Oksidatif stresin ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve karaciğer hasarı gibi birçok hastalığın oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (Kehrer ve Smith 1994, Dalle-Donne ve ark. 2006; Palmieri ve Sblendorio 2006; Valko ve ark. 2007; Uysal 2010).

Karaciğer vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturan, organizmadaki en büyük bezdir ve çok önemli metabolik fonksiyonları yerine getirmekle görevlidir (Burroughs ve Westaby 2005). Karaciğer anatomik lokalizasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal rolü nedeniyle birçok toksik, zararlı madde ve ilaçlara sıkça maruz kalan bir organdır. Karaciğer hasarı çok geç belirti vermesi dolayısıyla tedavisi zor olan patolojik bir durumdur. Son yıllarda bazı ticari bitkisel preparatlar karaciğer hasarında kullanılmaktadır. Bu nedenle halk arasında kullanımı olan birçok bitkisel kaynaklı ilaç, farklı kimyasal maddeler ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı, deneysel hayvan modellerinde, olası antioksidan ve hepatoprotektif etkileri nedeniyle araştırılmaktadır (Dhanabal ve ark. 2006; Naaz ve ark. 2007; Jain ve ark. 2008).

$\text{CCl}_4$  ile oluşturulan hepatotoksisite, ilaçların ve bitki ekstraktlarının hepatoprotektif etkilerini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan bir modeldir.  $\text{CCl}_4$  karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından triklorometil ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ) ve triklorometilperoksi ( $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ ) radikallerine dönüştürülür. Bu radikaller çok aktiftir, tüm hücrel moleküllerle etkileşebilir ve lipid peroksidasyonunu başlatarak membran bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta ciddi doku hasarının meydana gelmesine neden olurlar (Recknagel ve ark. 1989; Weber ve ark. 2003).

*Amaranthus lividus* L. (syn=*Amaranthus blitum* L.) ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesinde “darı mancarı” olarak bilinen ve halk arasında yiyecek olarak kullanılan bir bitkidir. Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada *A. lividus* bitkisinin yaprak ve çiçekli dallarının su, metanol ve etil asetatlı ekstraktlarının *in vitro* antioksidan aktiviteleri araştırıldığında, etil asetat ekstresinin en yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu,

sulu ekstrenin ise en düşük antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Ozsoy ve ark. 2009).

*A. lividus* türünün hayvan modellerinde antioksidan ve hepatoprotektif aktiviteleri üzerine daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda CCl<sub>4</sub> ile deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda *A. lividus* L. bitkisinin antioksidan ve hepatoprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla 9 gün boyunca 2 farklı dozda *A. lividus* ekstresi ile beslediğimiz sıçanlara deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturmak için 10. gün tek doz, intraperitoneal CCl<sub>4</sub> uygulandı. CCl<sub>4</sub> uygulamasından 24 saat sonra öldürülen sıçanların serum ve karaciğer örneklerinde çeşitli biyokimyasal deneyler yapıldı. Serumda, karaciğer fonksiyonunun göstergesi olan alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri ile bilirubin düzeyleri tayin edildi. Ayrıca serumda, antioksidan etki gösterdikleri bilinen paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) aktiviteleri de incelendi. Karaciğerde ise lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ve hücrelerin antioksidan durumunu gösteren katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (G-S-T), glutatyon redüktaz (GSH-R) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ölçüldü ve glutatyon (GSH) miktar tayini yapıldı. Karaciğerde ayrıca güçlü oksidatif özelliği olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi de incelendi. Deneylerimizde hepatoprotektif etkiye sahip olduğu bilinen silimarin standart olarak kullanıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Atomlardaki elektronlar orbital olarak adlandırılan bölgelerde bulunur ve her orbital zıt spinli olmak üzere iki elektron içerebilir. **Serbest radikaller**, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Her türlü kimyasal ve biyokimyasal tepkime, atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir, bu nedenle dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir ve sembol olarak paylaşılmamış elektronun bulunduğu atomun üzerinde nokta ile gösterilirler (Southorn ve Powis 1988; Halliwell 1989).

Serbest radikaller 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Palmieri ve Sblendorio 2006):

1. Kovalent bağların homolitik yıkılması. Kırılma sonucunda her iki atom bir paylaşılmamış elektron içerir. ( $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$ )
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi. ( $XH_2 - e^- \rightarrow XH^\bullet$ )
3. Normal bir moleküle elektron transferi. ( $Y + e^- \rightarrow Y^\bullet$ )

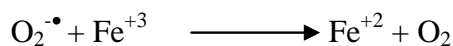
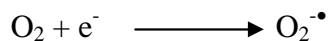
Moleküler oksijen, dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerdiği için **biradikal** yapıya sahiptir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedir. Biradikal oksijen, radikal olmayan moleküllerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Biyolojik sistemlerdeki en etkili serbest radikaller, **reaktif oksijen türleri (ROT)** olarak adlandırılan oksijenin radikal türevleridir. Bu terim süperoksit radikali ( $O_2^\bullet$ ) veya hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) gibi oksijen merkezli radikallerin yanında, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hipoklorik asit ( $HOCl$ ) gibi non-radikal türleri de kapsar. Azottan oluşan **reaktif nitrojen türleri (RNT)**'nin en önemlisi nitrik oksit radikali ( $NO^\bullet$ )'dir (Tablo 2-1) (Auroma 1998; Mügge 1998).

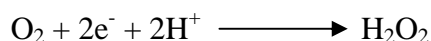
**Tablo 2-1: Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler**

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal olmayanlar</b>
Süperoksit, (O <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Hidrojen peroksit, (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Hidroksil, (OH <sup>•</sup> )	Singlet oksijen, ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )
Peroksil, (ROO <sup>•</sup> )	Hipoklorik asit, (HOCl)
Alkoksil, (RO <sup>•</sup> )	Ozon, (O <sub>3</sub> )
Nitrik oksit, (NO <sup>•</sup> )	Peroksinitrit, (ONOO <sup>-</sup> )
Azot dioksit, (NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Lipit hidroperoksit, (LOOH)

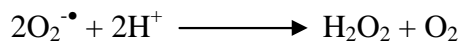
**Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•</sup>)**, oksijene bir elektron aktarılması ile oluşur ve oldukça kuvvetli bir indirgeyicidir. Serbest radikal olmasına rağmen kendisi direkt olarak zarar vermeyen süperoksit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olduğu için önemlidir (Southorn ve Powis 1988; Palmieri ve Sblendorio 2006).



**Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**, oksijenin iki elektronla indirgenmesi ile oluşur.

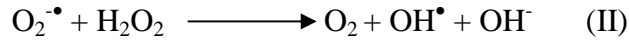
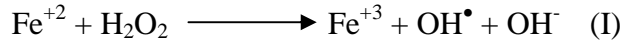


Biyolojik sistemlerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in asıl üretimi süperoksitin radikalinin dismutasyonu ile olur. Serbest radikal reaktanlardan, radikal olmayan ürünler meydana geldiği için dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir ve kendiliğinden (çok yavaş) veya süperoksit dismutaz enzimi katalizinde gerçekleşir (Palmieri ve Sblendorio 2006).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikal yapısında olmamasına rağmen ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>+2</sup> ve diğer geçiş metalleri varlığında Fenton reaksiyonu (I) ile ve süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu (II) ile, en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>)

oluşumuna sebep olur (Southorn ve Powis 1988; Kehrer ve Smith 1994; Palmieri ve Sblendorio 2006).

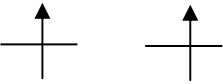
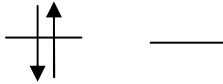
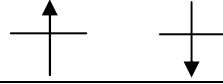


Metal katalizi olmadığında, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve her ikisi de aslında zararsız türlerdir (Palmieri ve Sblendorio 2006).

**Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>)**, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu ve ayrıca iyonize edici radyasyon sonucunda oluşur. Hidroksil radikali oldukça reaktif ve oksitleyici bir radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde her türlü biyolojik molekülle özellikle protein, DNA ve lipitlerle etkileşerek yeni radikallerin oluşmasına ve moleküllerde büyük hasara sebep olur (Southorn ve Powis 1988; Halliwell 1989; Auroma 1998; Palmieri ve Sblendorio 2006).

**Singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)**, moleküler oksijenin dış orbitallerinde bulunan elektronlardan birinin enerji alarak spininin değişmesi ile singlet oksijen oluşur. İki tip singlet oksijen vardır, zıt spinli elektronların aynı orbitalde olduğu delta formu (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>Δg) ve farklı orbitallerde olduğu sigma formu (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>Σg<sup>+</sup>) (Tablo 2-2). Reaktivitesi oldukça yüksek olan singlet oksijen, membran lipitleri dahil olmak üzere pek çok molekülü oksitleyebilecek özelliktedir ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önemlidir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Southorn ve Powis 1988).

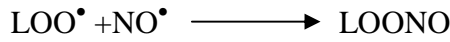
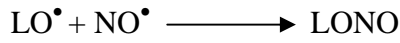
**Tablo 2-2: Moleküler oksijenin farklı formlarının en dış orbitaldeki elektronlarının konfigürasyonu-Southorn ve Powis 1988'den**

Durum		Reaktivite
Moleküler oksijen		Düşük
Delta singlet oksijen		Yüksek
Sigma singlet oksijen		Çok yüksek

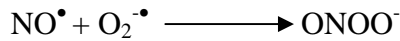
Oklar elektron spinlerini göstermektedir.

**Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>)**, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen enzim ailesi tarafından sentezlenen, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyon gibi çeşitli fizyolojik görevleri olan önemli bir sinyal molekülüdür (Pryor ve ark. 2006; Valko ve ark. 2006).

Paylaşılmamış elektron içermesine rağmen, diğer radikal türlerle kıyaslandığında reaktivitesi son derece düşük olan NO<sup>•</sup>, metal içeren merkezler ve radikallerle büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipit radikalleri (L<sup>•</sup>) ile tepkimeye girmesi NO<sup>•</sup>'e antioksidan bir etki kazandırır (Pryor ve ark. 2006):



Süperoksit radikali ile NO<sup>•</sup> arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), non-radikal reaktif bir türdür, hidroksil radikaline benzer etkiye sahip olan peroksinitrit, direkt olarak DNA, protein ve lipitlere zarar verebilir. Ayrıca NO<sup>•</sup> ve moleküler oksijen arasındaki reaksiyonlar ile oluşan azot dioksit (NO<sub>2</sub>) ve diazot trioksit (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) biyolojik moleküllerde nitrozasyona neden olan bileşiklerdir ve peroksinitrit ile birlikte NO<sup>•</sup>'in toksisitesinden sorumludurlar (Brown ve Borutaite 2006; Pryor ve ark. 2006; Valko ve ark. 2006):

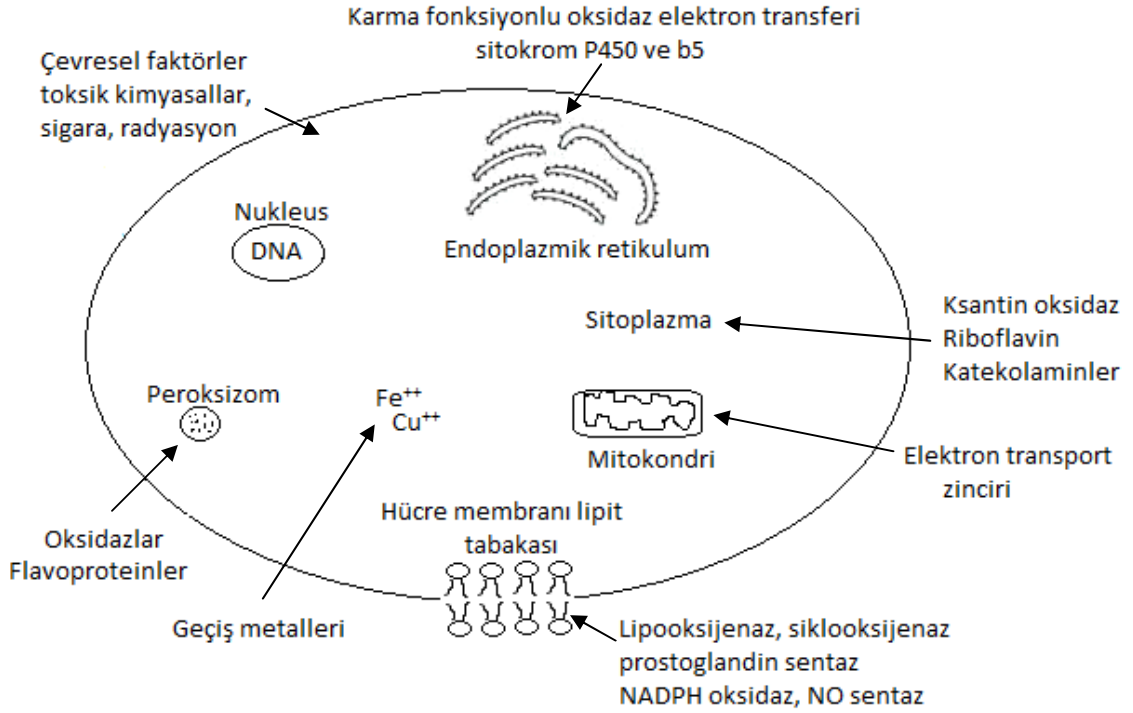


Diğer serbest radikaller, oksidan bir radikalın (örn OH<sup>•</sup>) karbohidrat, lipit, nükleik asit veya protein gibi bir biyomolekülle (RH) etkileşmesi sonucunda karbon merkezli radikal (R<sup>•</sup>) oluşumuyla başlayan ve zincir şeklinde devam eden reaksiyonlar sonucunda meydana gelirler. Peroksil (ROO<sup>•</sup>), alkoksil (RO<sup>•</sup>) ve tiyil (RS<sup>•</sup>) bu şekilde oluşan radikallerdir (Palmieri ve Sblendorio 2006).

### 2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Moleküler oksijenle etkileşen her aerobik hücrede ROT oluşumu kaçınılmazdır. İyonize edici radyasyona maruz kalma gibi alışılmadık durumlar dışında, hücrede serbest radikaller genellikle elektron transfer reaksiyonları sırasında meydana gelir.

ROT endojen ve eksojen etkenlerin her ikisi ile oluşabilir (Şekil 2-1). Potansiyel endojen kaynaklar mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatör hücre aktivasyonunu içerir (Tablo 2-3) (Mügge 1998; Palmieri ve Sblendorio 2006; Valko ve ark. 2006).

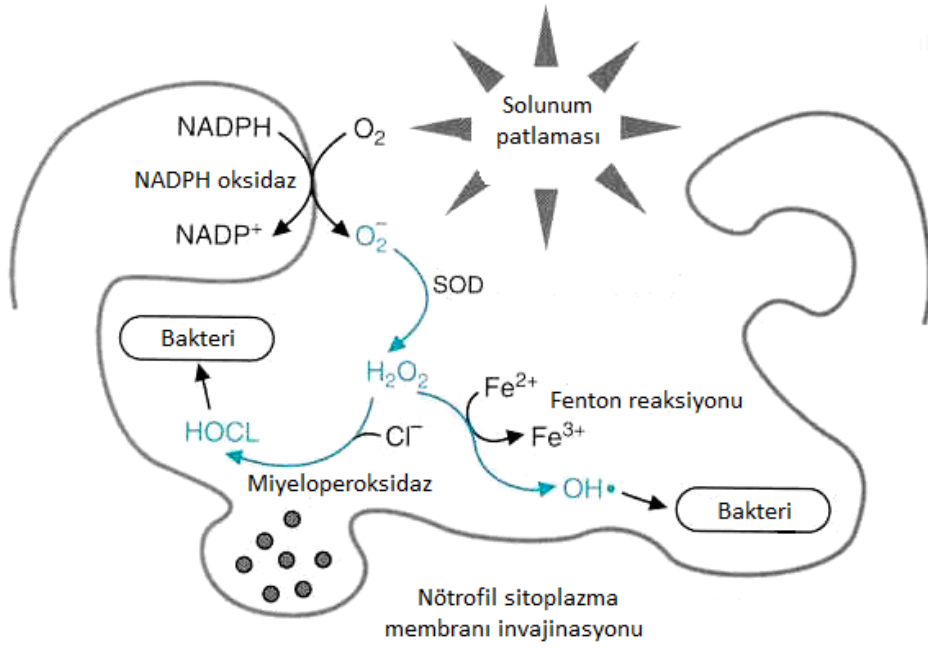


**Şekil 2-1: Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları-Kehrer 1994'ten değiştirilerek.**

**Tablo 2-3: Hücrelerdeki ROT kaynakları-Mügge 1998'den**

- Küçük moleküllerin redoks reaksiyonları (tiyoller, flavinler, kinonlar, katekolaminler)
- Mikrozomal NADH/NADPH oksidaz, sitokrom P-450 ailesi
- Ksantin oksidaz
- Oksihemoglobin/oksimiyoglobin
- Mitokondriyal solunum zincirinden sızıntı
- Araşidonik asit yolu (lipooksijenaz, siklooksijenaz)
- Fagosit NADPH oksidaz
- Vasküler NAD(P)H oksidaz
- Nitrik oksit sentaz (substrat veya kofaktör eksikliği, LDL varlığı)

Makrofajlar ve nötrofiller gibi aktive olmuş fagositler mikroorganizmalara karşı savunma için önemli miktarda süperoksit radikali üretirler. Serbest radikaller bakteri ve fagosit plazma membranı arayüzünde oluşsa da süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve diğer reaktif türlerin fagosit dışına sızıntısı kaçınılmazdır (Şekil 2-2) (Mügge 1998; Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006).

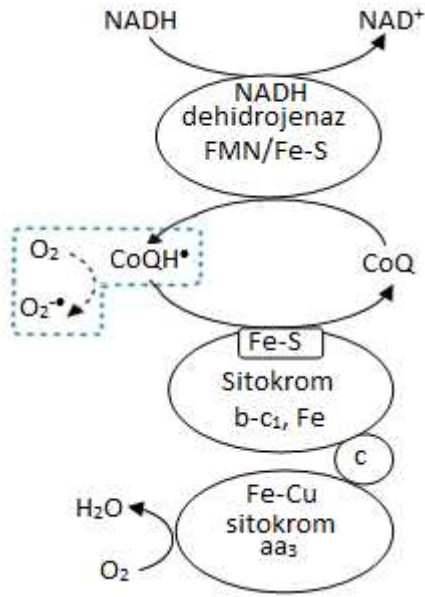


**Şekil 2-2: Aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimi-Altınışık 2001'den.**

Hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinde, NADH dehidrojenaz ve koenzim Q (CoQ) gibi elektron taşıyıcılarından oksijene elektron kaçağının olmasıdır (Şekil 2-3). Bunun dışında, hücrenin diğer fraksiyonlarında da, memrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında serbest radikaller ortaya çıkar. Örneğin ksantin oksidaz önemli bir serbest radikal kaynağıdır (Southorn ve Powis 1988; Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Askorbik asit, tiyoller (glutatyon, sistein), adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bileşiklerin otooksidasyonu hücrelerde oluşan süperoksitin başka bir kaynağıdır (Southorn ve Powis 1988; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Bunların yanında insanlar, radyasyon, UV ışık, hava kirliliği ve bazı ilaçlar gibi ROT oluşumuna sebep olan çeşitli çevresel faktörlere sürekli maruz kalırlar (Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006).



Şekil 2-3: Mitokondriyal elektron transport zinciri ve elektron kaçağı -Altınışık 2001'den.

### 2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin başlıca lipid, protein ve nükleik asit olmak üzere tüm önemli bileşenlerine etki ederler ve sonuçta hücre veya doku hasarına neden olurlar (Tablo 2-4) (Southorn ve Powis 1988; Wu ve Cederbaum 2003).

Tablo 2-4: Serbest radikallerin hücre bileşenlerinde oluşturduğu zararlı etkiler-Southorn ve Powis 1988'den

**Lipitler:** Organel ve plazma membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu

**Proteinler:** Sülfhidril grubu içeren enzimlerin oksidasyonu → enzim inaktivasyonu

**Karbohidratlar:** Polisakkaritlerin depolimerizasyonu

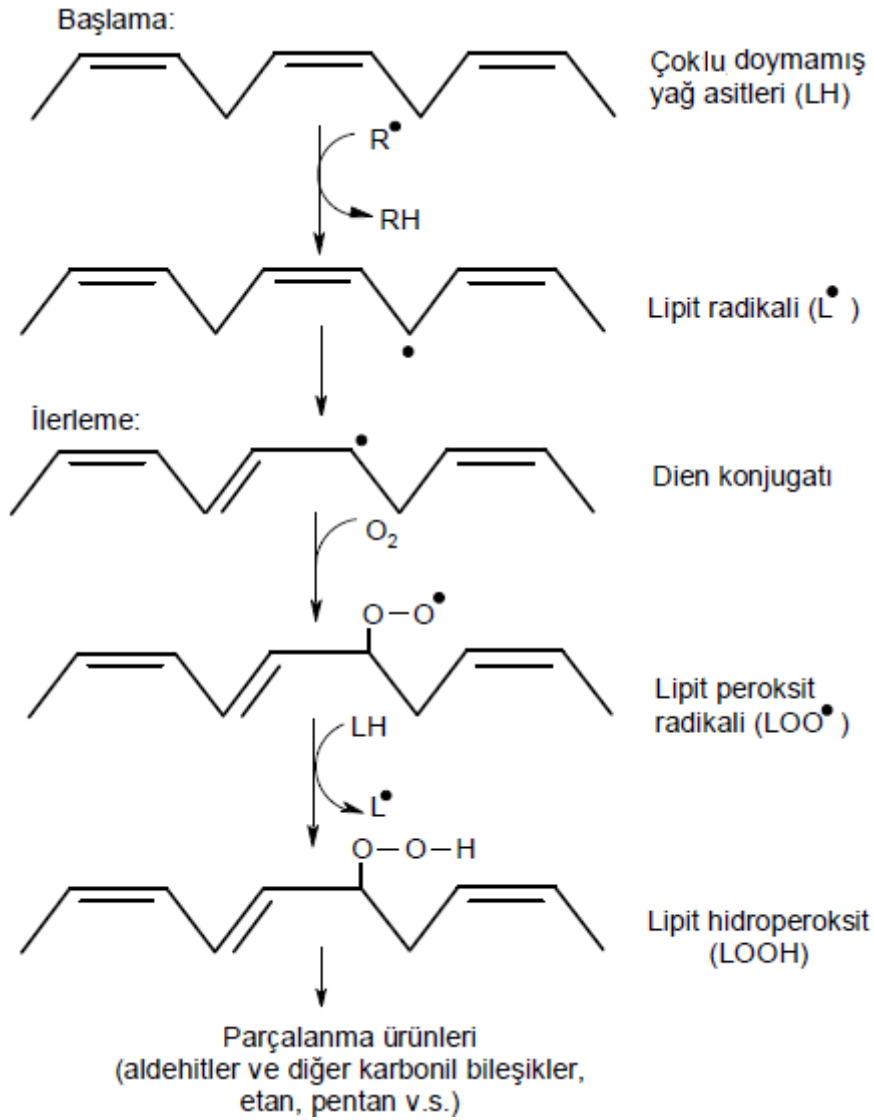
**Nükleik asitler:** Baz hidroksilasyonu, çapraz bağlar, DNA ipliğinin ayrılması (mutasyona ve protein, nükleotid ve yağ asidi sentezi enzimlerinin inaktivasyonuna sebep olur)

**Serbest radikallerin lipitler üzerine etkileri:** Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarının temel bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer

ve peroksidasyon ürünleri açığa çıkar. PUFA'nin oksidatif yıkımı **lipit peroksidasyonu** olarak bilinir ve kendi kendine devam eden zincir reaksiyonlar şeklinde ilerlediği için son derece zararlıdır. Hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijen lipit peroksidasyonunun başlamasına neden olan başlıca reaktif türlerdir (Southorn ve Powis 1988; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Lipit peroksidasyonu genellikle PUFA zincirindeki (LH)  $\alpha$ -metilen gruplarından hidrojen atomunun çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali ( $L^\bullet$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. İlk olarak molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatı oluşur. Daha sonra lipit radikaline hızlı bir şekilde oksijenin eklenmesi ile peroksil radikali ( $LOO^\bullet$ ) meydana gelir. Bu lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer PUFA moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ( $LOOH$ ) dönüştür ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil 2-4). Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı için geçiş metallere iyon katalizi gereklidir ve yıkımları sonucunda çoğu biyolojik olarak aktif, malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve 2-propenal gibi aldehitler ve hidrokarbon gazları oluşur. Bu bileşikler oluştukları yerden diffüze olup hücrenin diğer kısımlarına da hasarı yayarlar. (Southorn ve Powis 1988; Halliwell ve Chirico 1993; Palmieri ve Sblendorio 2006).

Lipit peroksidasyonu, membranların akışkanlığı gibi biyolojik özelliklerinde değişikliklere ve membrana bağlı enzim veya reseptörlerin inaktive olmasına öncülük ederek, normal hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve doku geçirgenliğinin artmasına sebep olur. Lipit peroksidasyonu, direkt olarak membranların yapısına ve reaktif aldehitlerin üretimi ile indirekt olarak hücrenin diğer bileşenlerine hasar verdiği için çok zararlı bir reaksiyon zinciridir (Dalle-Donne ve ark. 2006).

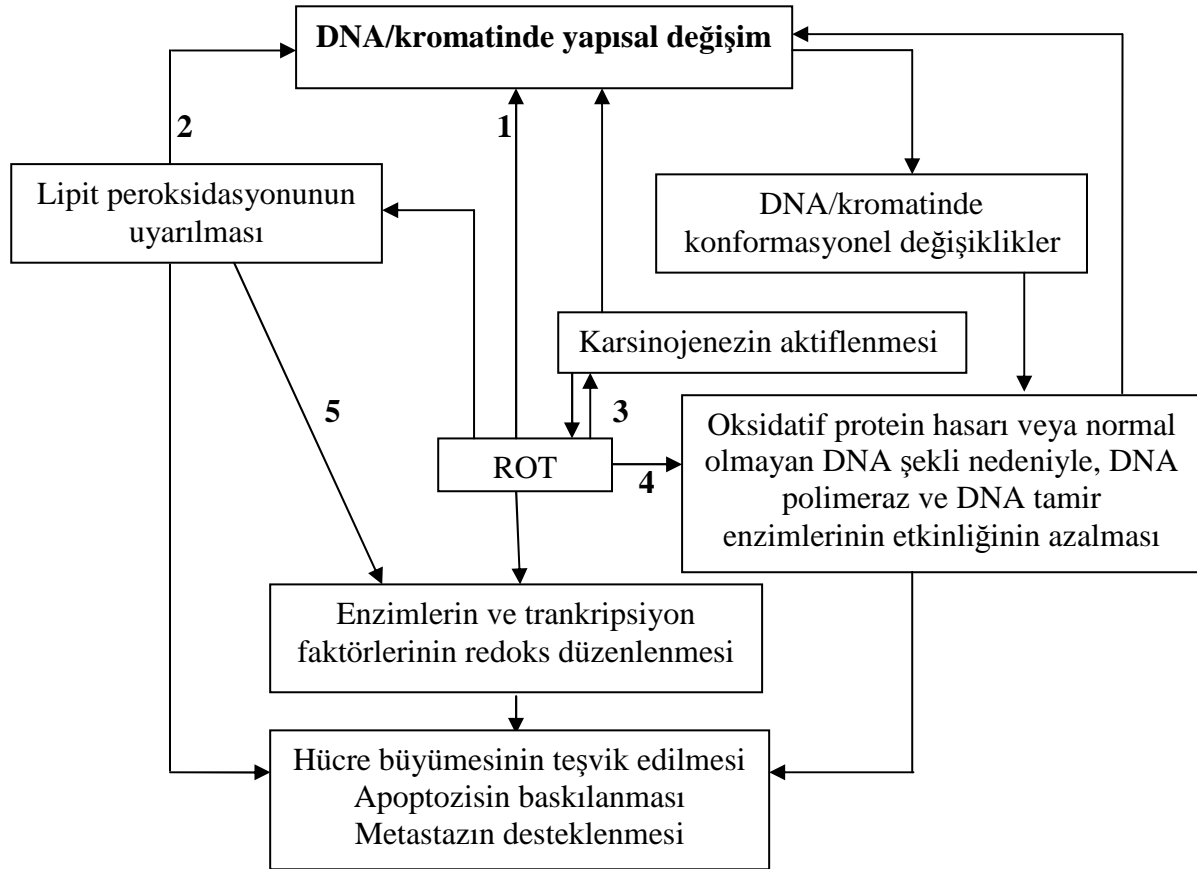


**Şekil 2-4: Lipit peroksidasyonu-Uysal 2010'dan.**

**b) Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri:** Proteinler, serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri içerdikleri amino asitlere bağlıdır. Tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi doymamış bağ veya kükürt içeren amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Protein oksidasyonu sonucunda önemli sülfidril gruplarının kaybı ve karbonil gruplarının oluştuğu amino asit modifikasyonları görülür. Bu olaylar, proteinlerin üç boyutlu yapılarında değişikliklere, agregasyon veya çapraz bağlı proteinlerin oluşumuna sebep olarak

protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açar (Kehrer ve Smith 1994; Wu ve Cederbaum 2003; Palmieri ve Sblendorio 2006).

c) **Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri:** Serbest radikallerin DNA ile etkileşimi, zincir kırılmaları, nükleotid kaymaları, pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve DNA denatürasyonu gibi çeşitli olaylara neden olur (Şekil 2-5) (Wu ve Cederbaum 2003; Halliwell 2007).

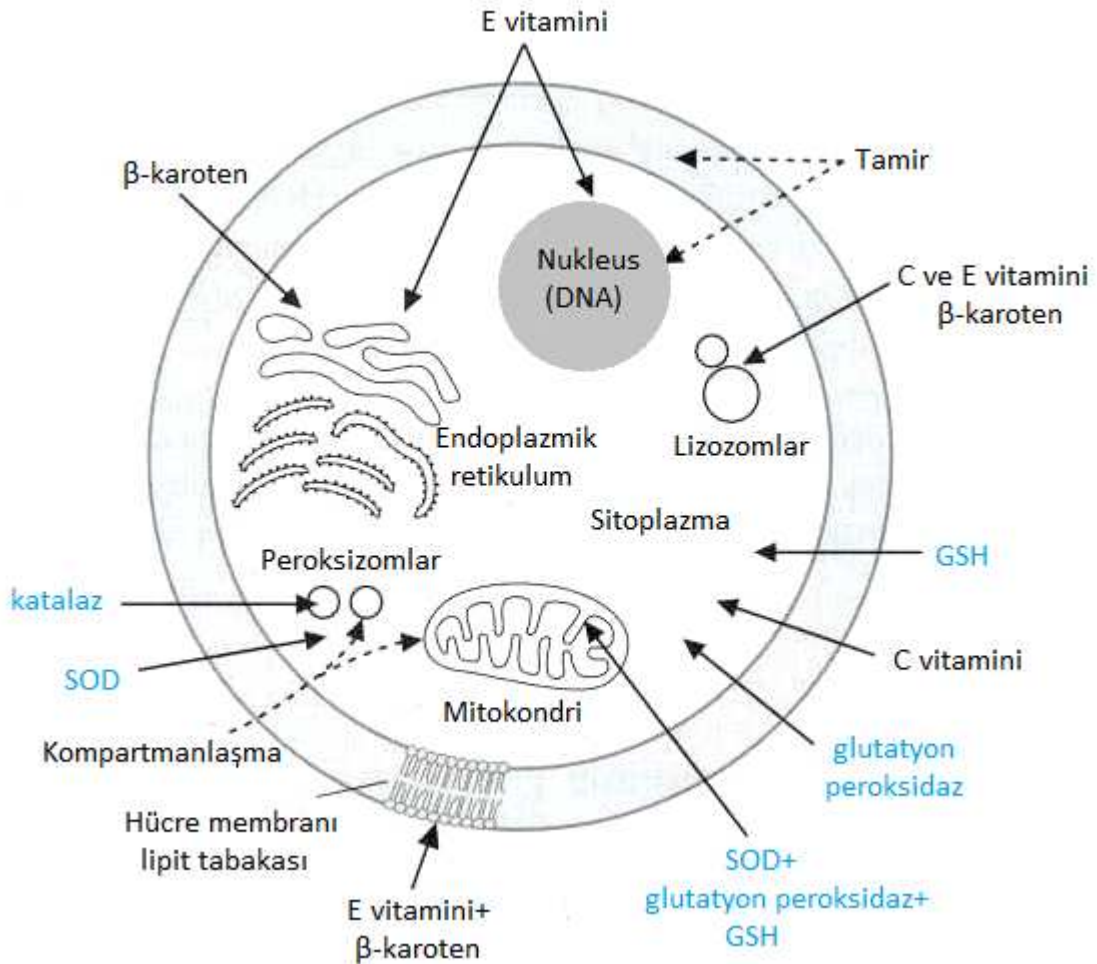


**Şekil 2-5: ROT'nin DNA üzerine etkisi-Halliwell 2007'den.**

1- DNA'ya direkt oksidatif hasar. 2- Lipit peroksidasyonu aldehit son ürünlerinin (MDA, 4-HNE) DNA bazlarında değişime neden olması. 3- ROT, pro-karsinogenlerin karsinogenlere dönüşümüne ve bu karsinogenlerin bazıları da daha fazla ROT oluşumuna yardım edebilirler. 4- ROT kromatin proteinleri, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar (replikasyondaki hata oranı artabilir) gibi proteinlerde hasar oluşturabilir. 5- 4-HNE, pro-proliferatif ve güçlü bir redoks modulatörü olabilir ve diğer lipit peroksidasyonu ürünleri de benzer etkiyi gösterebilir.

## 2.2. Antioksidanlar

Hücreler, normal metabolik yollarda kaçınılmaz bir şekilde oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltacak mekanizmalara sahiptir (Southorn ve Powis 1988). **Antioksidanlar**, oksitleyici substratlarla karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunan ve bu substratların oksidasyonunu inhibe eden veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmışlardır. Antioksidanlar hücrenin membran ve sitoplazma olmak üzere her iki kısmında da bulunabilir ve enzimatik veya non-enzimatik yapıda olabilirler (Şekil 2-6) (Sies 1997; Palmieri ve Sblendorio 2006).



Şekil 2-6: Hücredeki antioksidan savunma sistemleri-Altınışık 2001'den.

Antioksidan savunmanın 3 temel mekanizması vardır. Serbest radikallerin oluşumunu önleyen **koruyucu antioksidanlar** ve oluşan serbest radikallerin etkilerini göstermelerini engelleyen **tutucu antioksidanlar** birincil savunma hattını oluştururlar (Tablo 2-5). Üçüncü mekanizma radikallerin sebep olduğu hasarı düzelten **tamir mekanizmaları**'dır (Sies 1993;1997).

**Tablo 2-5: Antioksidan savunma sistemleri**

<b>Metal iyonlarını bağlayan proteinler</b>	<b>Enzimler</b>	<b>Suda çözünen radikal tutucuları</b>	<b>Yağda çözünen radikal tutucuları</b>
Transferrin	Süperoksit dismutaz	Glutasyon	E Vitamini
Ferritin	Katalaz	C Vitamini	$\beta$ -Karoten
Seruloplazmin	Glutasyon peroksidaz	Ürik asit	Bilirubin
Haptoglobin	Glutasyon redüktaz	Sistein	Ubikinol
Albumin	Glutasyon-S-transferaz		Flavonoitler

### 2.2.1. Koruyucu Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT'ne karşı ilk savunma hattı elbette onların oluşumunun önlenmesidir. Koruyucu antioksidan savunma, özellikle demir ve bakır gibi metal iyonlarının bağlanması etkinliklerini kapsar. Transferrin, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler, radikal oluşumu reaksiyonlarının kontrolü açısından oldukça önemlidir. Metal iyonlarının proteinlere bağlı formda tutulmaları  $\text{OH}^\bullet$  oluşumunu önlemenin en güvenli yoludur (Sies 1997; Somogyi ve ark. 2007).

### 2.2.2. Tutucu (Süpürücü) Antioksidan Savunma Sistemleri

#### A) Non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri

Bu antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini sınırlandırmakla görevlidir. Temel hedef bir defa oluşunca aktivitesini ilerleten zararlı türlerin tutulmasıdır. Bu bir inaktivasyon işlemidir. Radikal bileşikler için final inaktivasyon, radikal ve reaktif olmayan son ürünlerin oluşumunu içerir. Serbest radikaller yapıları nedeniyle zincir

reaksiyon oluşturma eğilimindedir, örneğin paylaşılmamış elektron içeren bir bileşik başka bir bileşikle reaksiyona girerse paylaşılmamış elektronunu bu bileşiğe aktarır “radikal radikali oluşturur” (Sies 1993).

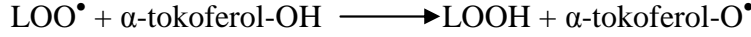
İkinci hedef, radikalın hassas olan hücresel kısımdan daha az zararlı olabileceği bölgeye transferidir, bu işlem oksitleyicilerin hidrofobik fazdan sulu faza transferi anlamına gelir ve oksitleyicilerin membrandan sitozole geçirilmeleri buna örnek olarak verilebilir. Biyolojik olarak en etkili tutucu antioksidanların sahip olması gereken özelliklerden birincisi, peroksil radikali gibi zincir reaksiyonları başlatıcı serbest radikallerle reaksiyona girerek etkisini sınırlandırmaları ve ikincisi, rejenere olmak için suda çözünür bileşiklerle etkileşebilmeleridir (Sies 1993).

Glutasyon ve askorbik asit hücrenin sulu fazında etki gösteren hidrofilik, E vitamini ve karotenoidler ise lipoproteinler ve hücre membranlarında etki gösteren hidrofobik karakterde radikal tutuculardır.

**Glutasyon (GSH):** Bir tripeptid olan glutasyon ( $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin) başta karaciğer olmak üzere tüm dokularda yüksek düzeyde bulunur ve birçok fonksiyonun yerine getirilmesini sağlar. GSH ana sülfür deposudur ve GSH-konjugasyonu sayesinde ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesinde görev alır. Okside formu (GSSG) ile birlikte hücrenin redoks dengesinin korunmasını sağlar. Hücredeki en önemli antioksidan molekül olan GSH’un yüksek indirgeyici özelliğinden merkezdeki nükleofilik sistein kalıntısı sorumludur ve  $H_2O_2$ , singlet oksijen, hidroksil radikali ve süperoksit radikali gibi ROT’ni indirgeyerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. GSH, glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon-S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar. Antioksidan savunmada GSH’un önemli bir rolü de, diğer bir suda çözünen güçlü antioksidan olan askorbik asidin rejenerasyonunu, askorbat-glutasyon siklusu ile, sağlamasıdır (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999; Valko ve ark. 2006).

**E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol):** E vitamini terimi, 4 tokoferol ve 4 tokotrienol olmak üzere 8 yağda çözünen doğal molekülü kapsar. Bunların tümü izoprenoid takısı içeren bileşiklerdir, yapılarında bulunan fenol halkasındaki hidroksil grubu aktif kısmı oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Bu moleküller arasında antioksidan aktivitesi en yüksek olan  $\alpha$ -tokoferoldür. Bütün membranların

yapısında bulunan  $\alpha$ -tokoferol, lipit peroksidasyonu sırasında oluşan alkoksil ( $LO^\bullet$ ), lipit peroksil ( $LOO^\bullet$ ) ve alkil ( $L^\bullet$ ) radikalleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı için “zincir kırıcı antioksidan” olarak bilinir.



Oluşan  $\alpha$ -tokoferol radikali kararlı bir yapıdadır ve fizyolojik şartlarda kendi kendine lipit peroksidasyonunu başlatmak için yeterli değildir.  $\alpha$ -Tokoferol radikalının tekrar yenilenmesinde glutatyon, askorbik asit ve koenzim Q10 (ubikinol) görev almaktadır. (Mügge 1998; Wang ve Quinn 1999; Palmieri ve Sblendorio 2006; Valko ve ark. 2006).

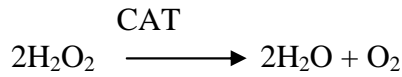
**C vitamini (askorbik asit):** Suda çözünen çok güçlü ve çok önemli bir antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentezlenemediği için diyet yoluyla alınması gerekir. C vitamini yapıca heksozlara benzemekte ve organizmada kolayca dehidroaskorbik asite oksitlenmektedir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek etkisizleştirmelerini sağlar. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve membranları da oksidan hasara karşı korumaktadır. Membranlarda ve lipoproteinlerde  $\alpha$ -tokoferol radikallerinin  $\alpha$ -tokoferole indirgenmesini sağlayarak E vitamininin rejenerasyonuna yardımcı olur (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999; Valko ve ark. 2006).

Askorbik asit metabolizmasının, siklusunun veya hücrel transportunun diabet, kardiovasküler hastalıklar, kanser, astım ve katarakt gibi çeşitli hastalıklarla ilgili olduğu düşünülmektedir (Mügge 1998).

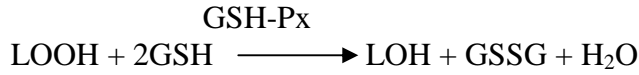
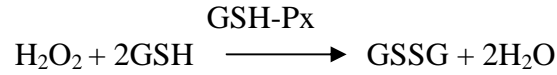
**Karotenoitler:** Bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan pigmentlerdir ve doğada 600'den fazla karotenoit bulunmaktadır. A vitamininin ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin başlıca etkisi singlet oksijeni baskılamasıdır. Ayrıca süperoksit, peroksil ve alkoksil radikalleri ile etkileşerek antioksidan etki gösterir (Valko ve ark. 2006).

## B) Enzimatik antioksidan savunma sistemleri

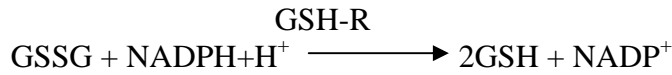
**Katalaz (CAT):** Başlıca peroksizomlarda, daha az olarak sitozol ve mikrozomal fraksiyonda bulunan tetramerik bir hemoproteindir. Katalaz, yüksek konsantrasyonda oluşan  $H_2O_2$ 'i oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler ve böylece hidroksil radikali oluşumunu engeller (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999; Matés ve ark. 1999; Wu ve Cederbaum 2003).



**Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):** Sitozolde bulunan GSH-Px,  $H_2O_2$  ve yağ asidi hidroperoksitlerini (LOOH) metabolize eden selenyum içeren bir enzimdir. Bu reaksiyonlar sırasında glutasyon (GSH) hidrojen vericisi olarak görev yapmakta,  $H_2O_2$  ve LOOH'ler indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir (Southorn ve Powis 1988; Brigelius-Flohe 1999; Matés ve ark. 1999).



**Glutasyon redüktaz (GSH-R):** GSH-Px'in katalizlediği, hidroperoksitlerin indirgenmesi reaksiyonu sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş formuna (GSH) dönüşümünü katalizler (Southorn ve Powis 1988).



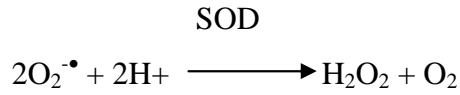
**Glutasyon-S-transferaz (GST):** Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GST'lar indirgenmiş glutasyonun endojen ve eksojen kaynaklı çeşitli bileşiklerle konjugasyonunu katalizleyerek, suda çözünen ve genellikle daha az reaktif metabolitler şeklinde organizmadan uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır.



Bazı GST izoenzimleri lipid hidroperoksitlerine karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterir (Valko ve ark. 2006).

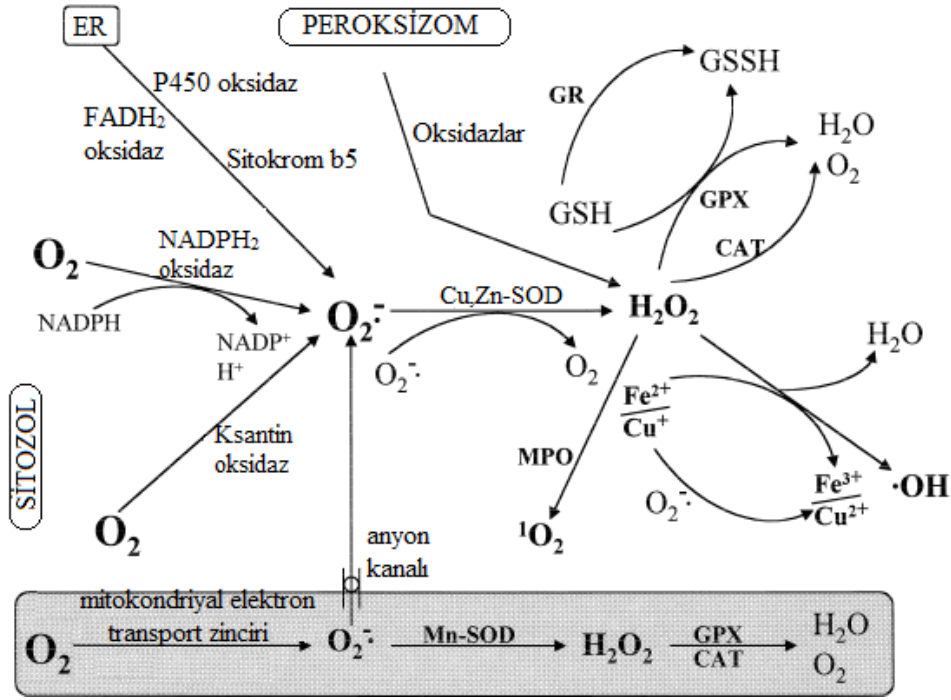


**Süperoksit dismutaz (SOD):** En etkili enzimatik antioksidanlardan biri olan süperoksit dismutaz, reaktivitesi yüksek olan süperoksit radikalinin ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ), daha az reaktif  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dismutasyonunu katalizleyen enzimdir (Chaudière ve Ferrari-Iliou 1999; Matés ve ark. 1999; Valko ve ark. 2006).



İnsanlarda 3 izoenzimi vardır, sitoplazmada bulunan Cu/Zn-SOD, mitokondri matriksinde bulunan Mn-SOD ve hücre dışı sıvılarda bulunan EC-SOD (Mügge 1998; Mates ve ark. 1999).

Şekil 2-7 hücrede reaktif oksijen türlerinin oluşum yollarını ve bunları ortadan kaldıran antioksidan enzimleri özetlemektedir.



Şekil 2-7: Moleküler oksijenden reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunlara karşı savunma mekanizmaları-Mates ve ark. 1999'dan.

### 2.2.3. Tamir Mekanizmaları

Doğal antioksidan savunmanın diğer bir şekli de, koruyucu ve radikal tutucu antioksidan yöntemler tamamen etkili olmadığında, oluşan hasarlı biyomolekülleri birikmeden ve hücre metabolizmasında ve canlılığında değişikliğe sebep olmadan uzaklaştıran **tamir mekanizmaları**'dır. Hasarlı bazlar veya tek veya çift zincir kırıklarının olduğu DNA hasarına, fosfolipit oksidasyon ürünlerinin olduğu membran hasarına ve protein ve diğer moleküllerdeki hasara etki eden, eski haline getirme veya yerini doldurma fonksiyonları olan DNA tamiri, proteolitik ve lipolitik enzimleri içeren multiple enzim sistemleri tamir mekanizmalarında görevlidir (Palmieri ve Sblendorio 2006; Sies 1997).

### 2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif/nitrozatif stres, ROT/RNT oluşumunun artması, antioksidan savunmanın azalması veya her ikisinin de görülmesi nedeniyle, hücresel antioksidan

savunmanın ROT ve RNT'nin oluşumunu tam olarak inaktive etmekte yetersiz kaldığı durum olarak tanımlanır ve biyolojik moleküllerde hasara sebep olur. Hasarın yerine bağlı olarak, çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir. Oksidatif stresin ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve karaciğer hasarı gibi birçok hastalığın oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 2-6) (Kehrer ve Smith 1994, Dalle-Donne ve ark. 2006; Palmieri ve Sblendorio 2006; Valko ve ark. 2007; Uysal 2010).

**Tablo 2-6: Serbest radikaller ile ilişkili bazı patolojik durumlar-Uysal 2010'dan**

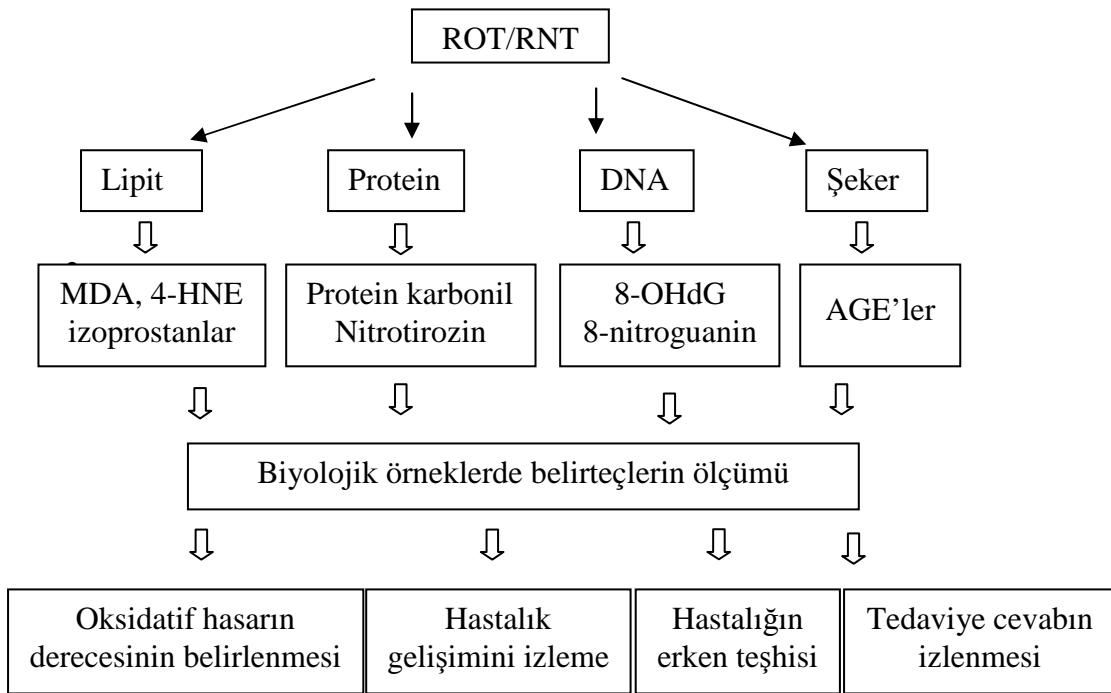
• Yaşlanma	• Aterosklereoz
• Kanser	• İskemi reperfüzyon hasarı
• Romatoid artrit	• Otoimmün hastalıklar
• Akciğer hastalıkları	• Kas hastalıkları
• Karaciğer bozuklukları	• Kan hastalıkları
• Radyasyon hasarı	• İnflamasyon
• Diabetes mellitus	• Merkezi sinir sistemi hastalıkları
• Böbrek bozuklukları	• Göz bozuklukları
• Deri bozuklukları	• Gastrointestinal bozukluklar

### **Oksidatif stresin ölçülmesi**

ROT/RNT çok reaktif ve yarı ömürlerinin çok kısa olması nedeniyle dokularda veya vücut sıvılarında direkt tayin edilmeleri zordur. Bu nedenle ROT/RNT'nin ölçülmesinde, ROT/RNT ile biyomoleküller arasındaki reaksiyonlardan açığa çıkan oksidasyon ürünlerinden yararlanılır. Bu oksidasyon ürünleri stabildir, tayin edilebilir konsantrasyonlarda birikebilirler, spesifik oksidasyon yollarını yansıtırlar ve hastalığın şiddeti ile bağlantılıdır, bu nedenle hastalıkların teşhisinde kullanılırlar (Şekil 2-8) (Dalle-Donne ve ark. 2006; Ogino ve Wang 2007).

Oksidatif stresin ölçülmesinde kullanılan diğer bir kriter de, antioksidan savunma sisteminin yetersizliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla aşağıda belirtilen parametreler tayin için kullanılır (Aruoma 1998):

- Antioksidan enzim düzeylerinin belirlenmesi: Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vb.
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların belirlenmesi: E vitamini, C vitamini,  $\beta$ -karoten, ürik asit, glutatyon, flavanoitler vb.



**Şekil 2-8: Oksidatif/nitrozatif stresle ilgili belirteçler-Ogino ve Wang 2007'den.**

8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin; AGE'ler: ilerlemiş glikasyon son ürünleri

Oksidatif stres ile ilgili ölçülen belirteçler arasında paraoksonaz (PON), aril esteraz (ARE) ve miyeloperoksidaz (MPO) enzimleri de bulunmaktadır.

**Paraoksonaz (PON) ve Aril esteraz (ARE):** PON ve ARE aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubundaki enzimlerdendir. PON, paraoksonaz, arilesteraz ve diazoksonaz gibi üç aktiviteye sahiptir. Karaciğerde sentezlenen HDL'ye bağımlı antioksidan bir enzim olan PON, LDL ve HDL'yi lipid peroksidasyonundan koruduğu ve HDL'nin başlıca anti-aterojenik bileşeni olduğu

düşünülmektedir. PON'ın lipit peroksitlerin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkili olduğu ve peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğu sanılmaktadır (Durrington ve ark. 2001; Gülcü ve Gürsu 2003).

**Miyeloperoksidaz (MPO):** MPO hemoperoksidaz ailesinin bir üyesidir. Reaktif oksijen türleri ve radikallerin oluşumunu sağlamaktadır. Doğal immün sistemde fizyolojik bir role sahiptir. MPO polimorfonükleer nötrofillerden salınan bir hemoprotein olup güçlü proinflamatuvar ve oksidatif özelliği vardır. Vasküler aterom plağında lipoproteinleri okside ederek aterosklerozde rol alabilir. Nötrofiller, hücre zarlarında bulunan NADPH-oksidadaz enzimi aracılığıyla moleküler oksijeni redükte ederek süperoksit radikali oluşturabilirler. Aktive olmuş nötrofiller aynı zamanda MPO salgılayarak, hidrojen peroksit ve klorür iyonlarından hipoklorik asit (HOCl) oluşmasını kataliz ederler (Şekil 2-2). HOCl, güçlü bir oksidandır ve sülfidril grubu ya da nitrojen içeren bileşikler ve DNA gibi birçok maddeyle kolayca reaksiyona girebilir. MPO, hem oluşturduğu serbest radikaller aracılığıyla antimikrobiyal etki gösterir, hem de dokuda oksidatif hasara yol açar (Roman ve ark. 2008).

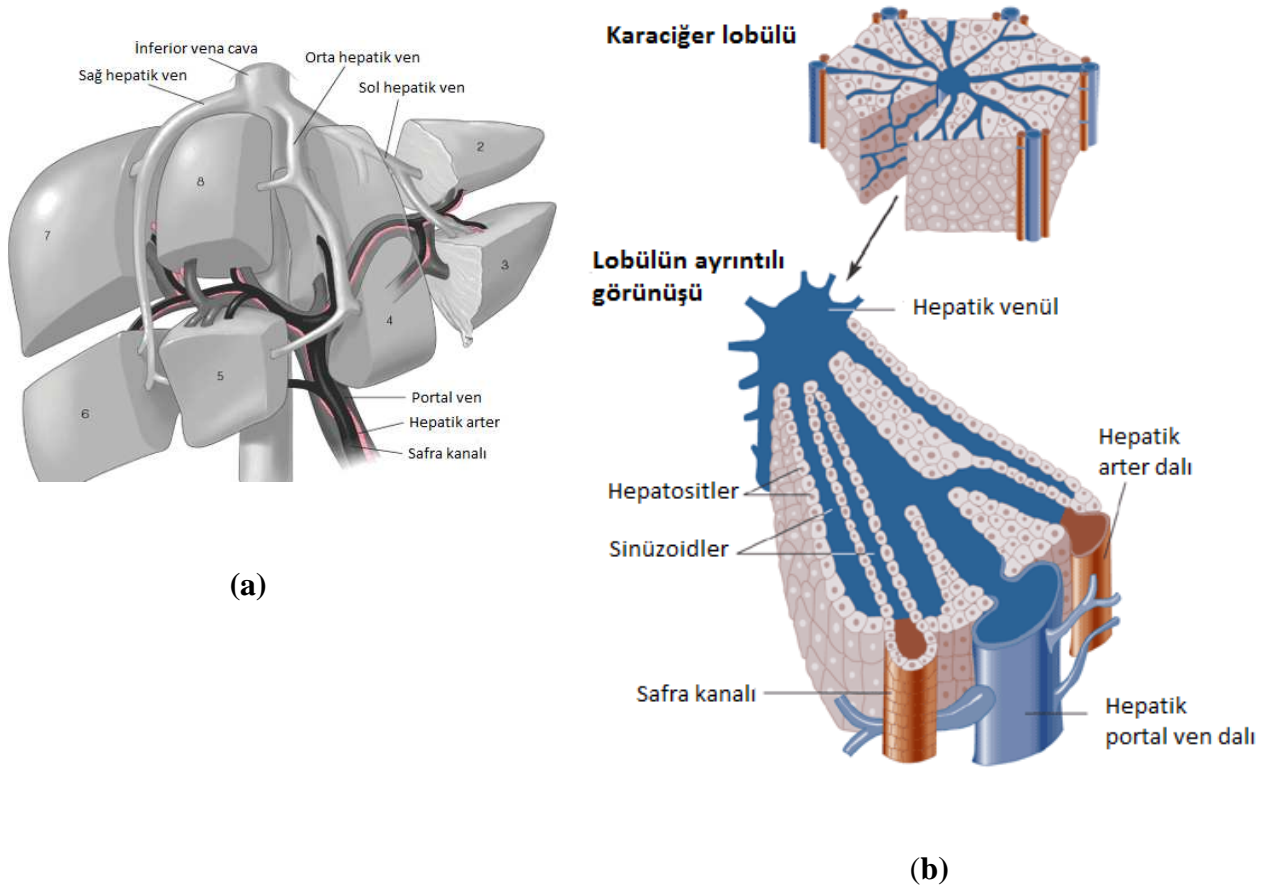
#### **2.4. Karaciğerin Anatomik ve Histolojik Yapısı**

Karaciğer vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturan, organizmadaki en büyük bezdir. Abdomende, sağ tarafta diyaframın altında yerleşmiştir. Orta hepatik ven ile fonksiyonel olarak sağ ve sol loblara ayrılan karaciğer, sağ, orta ve sol hepatik ven ile toplamda 8 segmenti içeren daha alt birimlere bölünür. Karaciğer ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür.

Karaciğerin kan akımı iki ana damar ile sağlanır. Hepatik arter, total kan akımının % 25'ini sağlar ve karaciğere oksijenden zengin kanı taşır. Hepatik arter ile kan akımının otoregülasyonu karaciğer kan akımının sabit kalmasını sağlar. Portal ven, genellikle gastrointestinal ve dalak kaynaklı kanı taşır. Portal ven aracılığı ile ince barsaklardan emilen maddelerin çoğu karaciğere taşınır, karaciğer kan akımının % 75'ini sağlar.

Köşelerinde portal alanların, merkezinde terminal hepatik venülün (santral ven) bulunduğu poligonal ünitelere karaciğer lobülü denilmektedir (Şekil 2-9). Bir portal alanda portal ven ve hepatik arter dalları ile interlobüler safra kanalı bulunur. Karaciğer

parenkimini oluşturan hepatositler, biri diğerinin üzerinde olacak şekilde ışnsal olarak santral vene doğru uzanırlar. Bu hücre dizileri arasındaki boşluklarda bulunan kapillere karaciğer sinüzoidleri denir. Hepatositler, bol oksijenli kandan yararlanma derecelerine göre gruplanırlar. Terminal vasküler dallara yakın hepatositler (zon 1), oksijen ve sindirim ürünlerinden zengin kanla beslenirler ve bu hepatositler çabuk rejenere olur ve karaciğer hücre hasarına daha dirençlidirler. Zon 2 ve 3'deki hepatositler ise vasküler yapılara daha uzak oldukları için, daha az oksijen ve sindirim ürünlerini içeren kanla beslenirler ve bu nedenle bu bölgelerde karaciğer rejenerasyonu uzun sürer (Balistreri ve Rej 1994; Tuncer ve Erzin 2002; Burroughs ve Westaby 2005).



**Şekil 2-9: Karaciğerin anatomik (a) ve histolojik yapısı (b).**

<http://www.svhrad.com/DigLib/Gastrointestinal/Liver/Segmental%20Anatomy/Liver%20Segments.htm>  
[www.medscape.com/.../98/449855/449855\\_fig.html](http://www.medscape.com/.../98/449855/449855_fig.html)

### 2.4.1. Karaciğerin Görevleri

Karaciğer aşağıda belirtildiği gibi bir çok metabolizma yolunda fonksiyonu gösteren önemli bir organdır (Burroughs ve Westaby 2005).

#### **Protein metabolizması**

**Sentez:** Karaciğer,  $\gamma$ -globulinler hariç dolaşımdaki bütün proteinlerin sentezlendiği başlıca yerdir. Transferrin ve seruloplazmin gibi taşıyıcı proteinler, akut faz ve diğer proteinler ve ayrıca bütün koagülasyon faktörleri karaciğerde sentezlenir.

**Yıkım:** Amino asitlerin transaminasyon ve oksidatif dezaminasyon ile yıkılmaları sonucu açığa çıkan amonyak, üreye dönüştürülerek böbreklerden atılır. Bu azotlu atıkların başlıca atılma yoludur.

#### **Karbohidrat metabolizması**

Glukoz homeostazı ve kan şeker düzeyinin korunması karaciğerin ana görevidir. Glikojenoliz ve glukoneojenez ile kan şekeri düzeyini ayarlar ve besinlerle alınan galaktoz, mannoz ve fruktoz gibi şekerleri glukozla dönüştürür.

#### **Yağ metabolizması**

Karaciğer lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynar. Ayrıca endojen trigliserit sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asitlerinin de novo sentezi karaciğerde gerçekleşir.

#### **Safra oluşturma**

Safra içerisinde su, elektrolitler, safra asitleri, kolesterol, fosfolipitler ve konjuge bilirubin bulunmaktadır. Hepatositlerin kandaki maddeleri alıp dönüştürerek safra kanalikülleri içine salgılamaları karaciğerin ekzokrin fonksiyonudur.

#### **Hormon ve ilaç inaktivasyonu**

İnsulin, glukagon, östrojen, büyüme hormonu, glukokortikoidler ve parathormon karaciğerde katabolize edilir.

İlaçlar ve toksinler, Faz I ve Faz II reaksiyonları ile suda çözünür bileşiklere dönüştürülerek idrar ve safra ile atılır.

### **İmmunolojik fonksiyonu**

Karaciğer, gastrointestinal sistemden, portal yolla taşınan bakteri ve diğer antijenler için bir süzgeç gibi davranır. Bu antijenler endotele bağlı makrofajlar olan Kupffer hücreleri ile fagosite edilerek uzaklaştırılırlar.

#### **2.4.2. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi**

Karaciğer fonksiyon testleri (Tablo 2-7) olarak da ifade edilen laboratuvar testleri, karaciğer fonksiyon bozukluğu bulunan hastada tanı koyma, hastalığın şiddetini tahmin etme, prognozu saptama ve tedaviyi yönlendirmek için gereklidir. Bütün bu sorunları çözebilecek bir test yoktur. Bu testlerin hepsi ayrı ayrı metabolik yolları yansıtmaktadır.

**Tablo 2-7: Karaciğer fonksiyon testleri-Balistreri ve Rej 1994'ten**

<p><b>Karaciğerde sentezlenen maddelere dayanan testler</b> Albumin, kolinesteraz, koagülasyon faktörleri</p> <p><b>Karaciğerde metabolize edilen maddelere dayanan testler</b> İlaçlar, ksenobiyotikler, bilirubin, kolesterol, trigliseritler</p> <p><b>Hasarlı dokudan salıverilen maddelere dayanan testler</b> Hasarlı hepatositlerden salınan endojen bileşikler; AST ve ALT Kanaliküler membran, safra kanalı epiteli ve merkezi ve periportal venlerin epitelinden salınan veya sentezi artan endojen bileşikler; ALP, <math>\gamma</math>-GGT, 5'-nükleotidaz</p> <p><b>Plazmadan karaciğer vasıtasıyla temizlenen maddelere dayanan testler</b> Endojen metabolitler; safra asitleri, bilirubin, amonyak Eksojen bileşikler; aminopirin, lidokain, kafein</p>
---

Karaciğerin sentez ve salgılama fonksiyonunun ve ayrıca karaciğerdeki hasarın göstergesi olarak en yaygın kullanılan testler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmektedir (Balistreri ve Rej 1994; Burroughs ve Westaby 2005).

**Serum albumin:** Karaciğerin sentez fonksiyonunun belirteçidir ve kronik karaciğer hastalıklarının şiddetini göstermesi bakımından önemlidir. Karaciğer hastalıklarında düşmüş serum albumin değerleri hastalığın kötüye gittiğinin göstergesidir. Akut karaciğer hastalıklarında başlangıç albumin değerleri normal olabilir.

**Bilirubin:** Normalde bilirubin serumda daima ankonjuge (indirekt) halde bulunur. Karaciğer hastalıklarında artmış serum bilirubin düzeyi genellikle karaciğer biyokimyasındaki diğer değişikliklerle birlikte. Bilirubinün konjuge (direkt) veya ankonjuge olup olmadığının araştırılması sadece bilirubin metabolizmasının kalıtsal bozukluklarında veya hemolizi ayırmak için gereklidir.

**Aminotransferazlar (Transaminazlar):** Bu enzimler hepatositlerde bulunurlar ve karaciğer hücre hasarında kana sızarlar. Ölçülen 2 enzim vardır:

- Aspartat aminotransferaz (AST), öncelikle mitokondriyal enzimdir (% 80 mitokondri, % 20 sitoplazma) ve AST karaciğerden başka kalp, kas, böbrek ve beyinde de bulunur. Yüksek düzeyleri hepatik nekrozis, miyokard infarktüsü ve kas yaralanmaları başta olmak üzere birçok hastalıkta görülür.
- Alanin aminotransferaz (ALT), sitozolik bir enzimdir ve sadece karaciğer hastalıklarında artış göstermesi nedeniyle, karaciğer için daha spesifiktir.

**Alkalin fosfataz (ALP):** Karaciğerin kanaliküler ve sinüzoidal membranlarında, ayrıca kemik, barsak ve plasenta gibi diğer pekçok dokuda da bulunur. Serum ALP değeri, intrahepatik veya ekstrahepatik de olabilen herhangi bir nedenle kolestatikte artar. Kolestatik sarılıkta ALP düzeyi normal değerinin 4-6 katına kadar yükselebilir. Karaciğer hastalıklarına bağlı en yüksek serum düzeyi (>1000 IU/L) hepatik metastazlar ve primer biliyer siroz ile birlikte görülür.

## 2.5. Karbon Tetraklorür (CCl<sub>4</sub>)

Karaciğer hücre hasarı, hem dış ortamdan, hem de hücre içinden çok çeşitli kimyasal etkenlerle oluşabilir. Hepatotoksik kimyasallar genellikle, karaciğerde metabolik aktivasyon gerektirenler ve gerektirmeyenler olarak iki gruba ayrılırlar. CCl<sub>4</sub>, ilk grup hepatotoksinlerdendir, karma fonksiyonlu oksijenazlar ile metabolize olarak

daha alt moleküllere ayrılır ve bu moleküller de başka enzim sistemleri için substrattır (Weber ve ark. 2003).

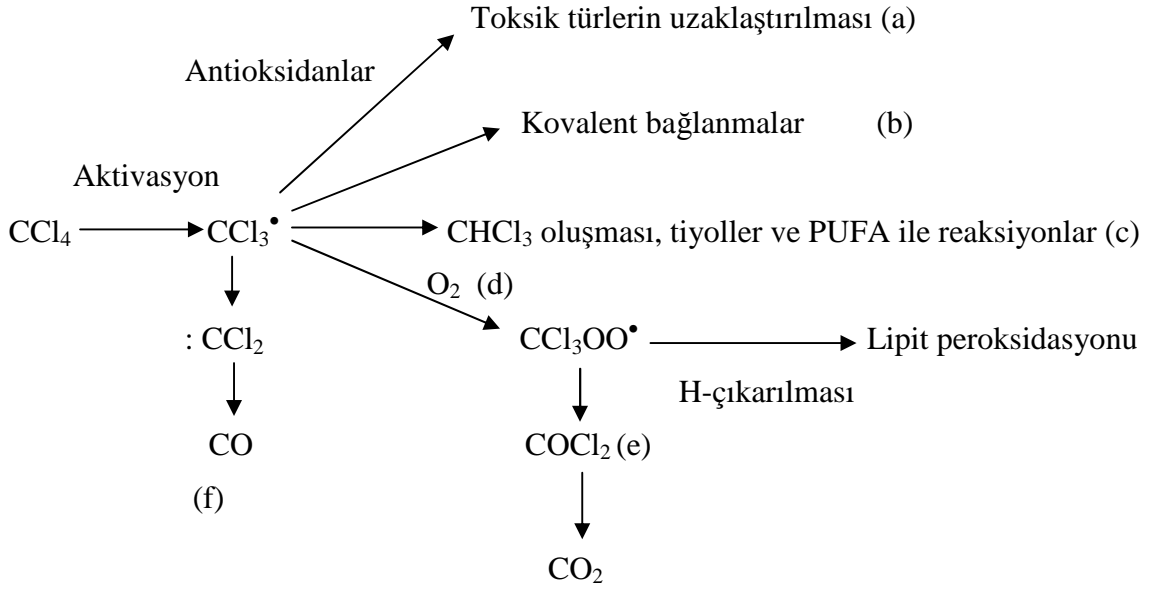
Reaktif bileşiklerin veya metabolitlerinin toksisitesi, DNA, protein, lipit ve karbohidrat gibi önemli hedef moleküllerle kovalent olarak bağlanmaları (primer) veya sekonder ilişki yoluyla (lipit peroksidasyonu, ROT oluşumu, GSH/GSSG oranında değişiklik) hedef moleküllerde değişiklik oluşturmaları sonucunda ortaya çıkar (Weber ve ark. 2003).

$CCl_4$ , hepatik steatozis (yağlı dejenerasyon), fibrozis, hepatoselüler ölüm ve karsinojenez gibi hepatotoksik etkilerin oluşum mekanizmasını aydınlatmak için model substrat olarak kullanılır.  $CCl_4$  toksisitesi biyokimyasal ve hücre organelleri düzeyinde kendini gösterir. Endoplazmik retikulum, plazma membranı, mitokondri ve Golgi aygıtı,  $CCl_4$  uygulaması sonucu etkilenen, hepatositlere ait temel hücresel yapılardır.  $CCl_4$ 'ün dozu, uygulama zamanı, tetikleyici etkenlerin varlığı veya etkilediği organizmanın yaşına bağlı olarak hücrelerde rejenerasyon oluşur ve karaciğer hasarı tamamen iyileşebilir (Slater 1984; Weber ve ark. 2003).

### **$CCl_4$ toksisitesinin mekanizması**

$CCl_4$  metabolizma reaksiyonları Şekil 2-10'da gösterilmektedir.  $CCl_4$  metabolizması, endoplazmik retikulumda karma fonksiyonlu sitokrom P450 (CYP) oksijenaz sistemi ile triklorometil ( $CCl_3^*$ ) radikali oluşması ile başlar.  $CCl_4$ 'ün biyotransformasyonunu gerçekleştiren temel sitokrom izoenzimi CYP2E1'dir, fakat CYP2B1, CYP2B2 ve CYP3A da bu mekanizmada etkili olabilir (Slater 1984; Recknagel ve ark. 1989; Weber ve ark. 2003; Manibusan ve ark. 2007).

$CCl_3^*$  radikali, nükleik asit, protein ve lipit gibi önemli hücresel moleküllerle reaksiyona girebilir veya en çoklu doymamış yağ asitlerinden olmak üzere, hidrojen çıkarma yolu ile kloroform şekline dönüşür. DNA ile bağlanması  $CCl_4$ 'ün neden olduğu karsinojenezin başlangıç noktası olabilir. Doymamış yağ asitlerine bağlanması sonucunda ise anormal dallanmış yağ asidi zincirleri oluşur (Slater 1984; Recknagel ve ark. 1989; Weber ve ark. 2003).



**Şekil 2-10: CCl<sub>4</sub>'ün metabolizması-Slater 1984'den.**

CCl<sub>4</sub>'ün CCl<sub>3</sub>• radikaline aktivasyonunu çeşitli reaksiyonlar takip eder. (a) CCl<sub>3</sub>• çeşitli radikal süpürücüler ile uzaklaştırılır, (b) çeşitli hücrel moleküllere kovalent bağlanma reaksiyonları, (c) hidrojen-çıkarma reaksiyonları, (d) oksijen ile bağlanması sonucu daha reaktif tür olan CCl<sub>3</sub>OO• radikali oluşması ve PUFA ile etkileşerek lipit peroksidasyonunu başlatması, (e) CCl<sub>3</sub>OO•'nin CO<sub>2</sub>'ye yıkılması reaksiyonları, (f) CCl<sub>3</sub>• karben ara ürünü üzerinden CO oluşturması.

Oksijen varlığında CCl<sub>3</sub>• radikali, triklorometilperoksi radikaline (CCl<sub>3</sub>OO•) dönüşür. Bu radikal, CCl<sub>3</sub>• radikalinden daha reaktiftir ve yarı ömrü daha kısadır. CCl<sub>3</sub>OO•, özellikle fosfolipitlerin yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek, lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatır. Lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünlerden olan reaktif aldehytler toksik etkilidirler ve enzim inhibisyonu, DNA hasarı ve lipoprotein salgılanmasının engellenmesine neden olarak karaciğer hasarının ilerlemesine katkıda bulunurlar. Reaktif aldehytlerin CCl<sub>3</sub>• ve CCl<sub>3</sub>OO• radikallerine göre reaktiviteleri daha az olduğu için hasarı oluştukları yerden daha uzağa, diğer hücrelere hatta başka organlara taşıyabilirler (Slater 1984; Recknagel ve ark. 1989; Weber ve ark. 2003; Manibusan ve ark. 2007).

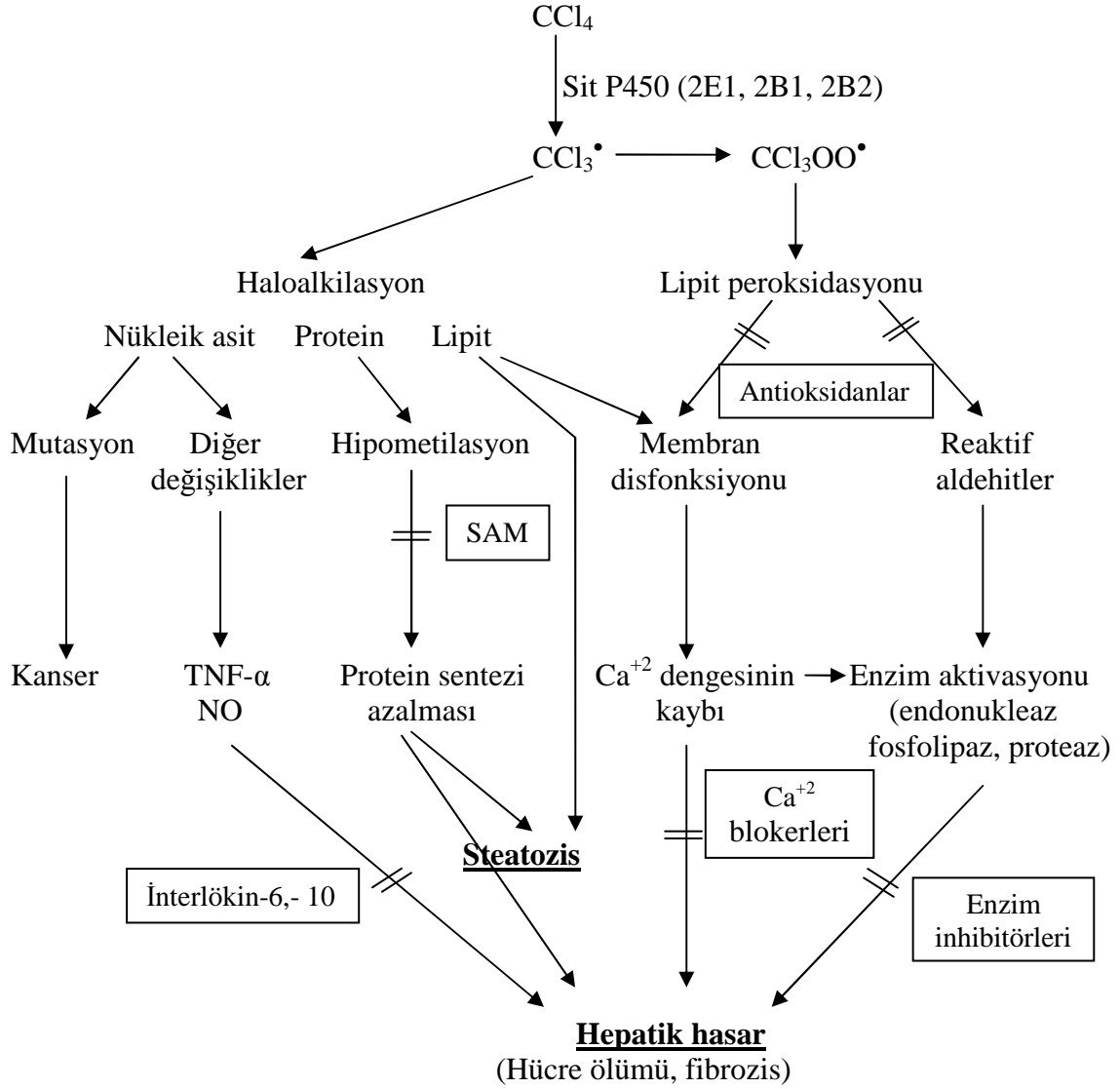
Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarının permeabilitesinin bozulması ile, hücrel kalsiyum dengesi kaybolur. Hücre içi yüksek Ca<sup>+2</sup> düzeyleri, hücre iskeleti yapılarının yıkılmasına ve proteazlar, endonukleazlar ve fosfolipazlar gibi çeşitli katabolik enzimlerin aktive olmasına neden olur. Bu olaylar

apoptozis veya nekrozis yoluyla hücre ölümü ile sonuçlanır (Weber ve ark. 2003; Manibusan ve ark. 2007).

$\text{CCl}_4$  zehirlenmesi ayrıca hücresel moleküllerde hipometilasyona yol açar. Hipometilasyonun RNA'da olması durumunda protein sentezi inhibisyonu, fosfolipitlerde olması durumunda lipoprotein salgılanmasının inhibisyonu meydana gelir (Weber ve ark. 2003).

Düşük dozlarda  $\text{CCl}_4$  uygulanması ile,  $\text{Ca}^{+2}$  dengesinin kaybı, lipit homeostazının bozulması, zararlı veya faydalı sitotoksinlerin salınması ve regenerasyon ile devam eden apoptotik olaylar gibi geçici etkiler gözlenir. Yüksek doz veya uzun süreli  $\text{CCl}_4$  uygulamalarında, steatozis (yağlı dejenerasyon), fibrozis, siroz ve hatta kanser gibi daha ciddi ve kalıcı etkiler ortaya çıkar (Weber ve ark. 2003).

$\text{CCl}_4$ 'ün karaciğer hasarı oluşturma mekanizmaları ve bu mekanizmaları önleyen etkenler Şekil 2-11'de özetlenmiştir.



**Şekil 2-11: CCl<sub>4</sub> ile oluşan karaciğer hasarının mekanizması-Weber ve ark. 2003'den.**

Altı çizili bölümler hepatotoksitenin ulaştığı son noktalardır. Bloklanmış oklar, kutudaki etken(ler)in yardımı ile toksikasyon yollarının kesintisini gösterir.

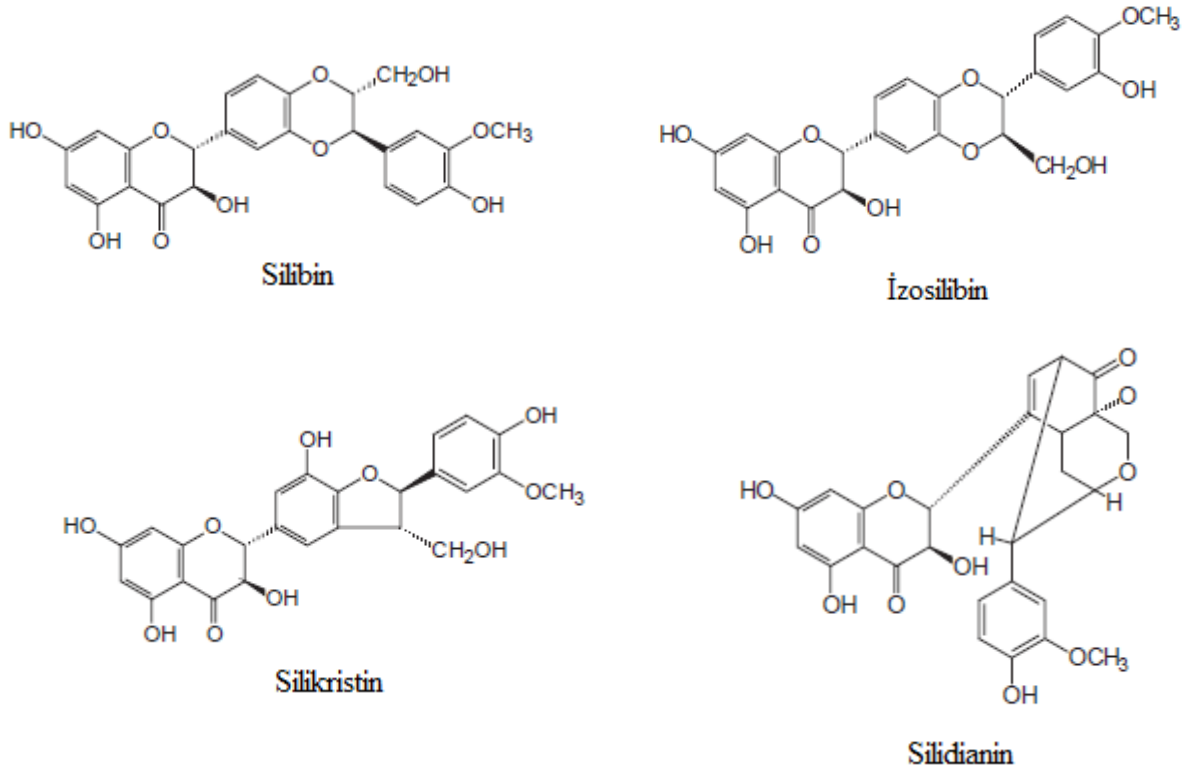
SAM: S-adenozil metiyonin; TNFα: Tumor nekrozis faktör α; NO: Nitrik oksit

## 2.6. Silimarin ve Genel Özellikleri

*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (devedikeni) (syn.*Carduus marianus* L.) (Meryem Ana dikeni), Asteraceae (Compositae) familyasına ait Akdeniz Bölgesi kökenli, 1 veya 2 yıllık otsu bir bitkidir (Davis 1975).

*S. marianum* karaciğer hastalıklarının tedavisinde en eski ve en kapsamlı araştırılmış olan bir bitkidir. *S. marianum* tohumları hepatit, siroz ve sarılık gibi karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında ve yılan sokması, böcek ısırıkları, mantar zehirlenmeleri ve alkol gibi kimyasal ve çevresel toksinlerin neden olduğu zehirlenmelere karşı karaciğeri korumak için 2000 yıldan beri kullanılmaktadır (Kren ve Walterová 2005; Gazák ve ark. 2007).

*S. marianum* bitkisinin aktif bileşeni **silimarin**'dir. Silimarin, silibin, izosilibin, silikristin ve silidianin adı verilen, flavonolignan izomerlerinin kompleks karışımından oluşmaktadır (Şekil 2-11) (Luper 1998; Kren ve Walterová 2005). Kapalı formülleri  $C_{25}H_{22}O_{10}$  olan bu bileşiklerin yapıları 1960'lı yıllarda aydınlatılmıştır (Wagner ve ark. 1965; 1968, Kaynak: Morazzoni ve Bombardelli 1995 p. 6-8).



Şekil 2-12: Silimarin kompleksinde bulunan flavonolignanlar.

*S. marianum* tohumlarından elde edilen standart ekstrater yaklaşık olarak % 70-80 oranında silimarin flavonolignanlarını, % 20-30 oranında da kimyasal olarak yapısı belirlenmemiş, çoğunlukla polimerik ve okside olmuş polifenolik bileşiklerin karışımını içerir. Silimarin kompleksinde en yüksek oranda bulunan ve en aktif olan izomer silibindir (% 60-70), daha sonra bunu silikristin (% 20), silidianin (% 10) ve izosilibin (% 5) takip eder, ayrıca başlıcası taksifolin olan birkaç flavonoid de bu komplekste bulunur. Silimarin, bitkinin tamamında bulunmakla birlikte daha çok meyve ve tohumlarda yoğunlaşmıştır (Luper 1998; Saller ve ark. 2001; Dhiman ve Chawla 2005; Kren ve Walterová 2005).

Silimarin suda çözünmeyen bir bileşiktir. Oral yoldan alındığında yavaş bir şekilde emilir ve maksimum plazma düzeyine 4-6 saatte ulaşır. Büyük bir kısmı safrayla, az bir miktarı da idrarla atılır. Silimarinin yarılanma ömrü 6-8 saattir. Oral alınan silimarin sadece % 20-50 oranında emilir (Schandalik ve ark. 1992; Weyhenmeyer ve ark. 1992; Morazzoni ve ark. 1993).

İnsan ve deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda silimarinin toksik etkilerine rastlanmamıştır. Klinik testlerde az sayıda görülen yan etkilerinden başlıcası geçici, ciddi olmayan gastrointestinal şikayetlerdir. Yüksek doz silimarin uygulanmasının, safra salgılanması ve akışını arttırması nedeniyle bazen laksatif etkileri de gözlenebilir (Luper 1998; Saller ve ark. 2001; Barnes ve ark. 2007; Monograph 1999).

### **2.6.1. Silimarinin Farmakolojik Etkileri**

Silimarinin hepatoprotektif, antioksidan, anti-inflmatuvar, antifibrotik ve antitümör özelliklerinin yanı sıra lipit peroksidasyonunun inhibisyonu, protein sentezinin uyarılması ve karaciğer rejenerasyonunun hızlanmasını içeren birçok farmakolojik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Silimarin ve silibinin farmakolojik aktiviteleri üzerine, özellikle hepatoprotektif etkileri bakımından, çok sayıda çalışma yapılmıştır, bunlar klinik uygulamalar için de destekleyici bulgular sağlamaktadır (Pradhan ve Girish 2006; Barnes ve ark. 2007).

### ***In vitro* deneyler ve hayvan çalışmaları**

**Antioksidan aktivitesi:** Silimarin ve silibin çeşitli serbest radikaller ile reaksiyona girerek onları daha stabil ve daha az reaktif bileşiklere dönüştüren antioksidanlardandır. Ayrıca silimarinin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ve glutasyon düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Bindoli ve ark. 1977; Valenzuela ve ark. 1986; Valenzuela ve ark. 1989; Pascual ve ark. 1993; Valenzuela ve Garrido 1994; Mira ve ark. 1994). Silimarinin hepatoprotektif etkisinin antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Muriel ve Mourelle 1990).

**Hepatoprotektif özellikleri:** Yapılan çeşitli çalışmalarda silimarin ve silibinin, CCl<sub>4</sub>, D-galaktozamin, parasetamol, etanol, ve  $\alpha$ -amanitin (*Amanita phalloides* mantarının ana toksik bileşeni) gibi çeşitli toksinlerin neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı hepatoprotektif aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Desplaces ve ark. 1975; Barbarino ve ark. 1981; Valenzuela ve ark. 1985; Compos ve ark. 1989; Muriel ve Mourelle 1990; Muriel ve ark. 1992; Chrungoo ve ark. 1997; Favari ve Pérez-Alvarez 1997). Yapılan diğer bazı çalışmalarda iskemi (Wu ve ark. 1993) ve gama ışınlarının (Kropáčová ve ark. 1998) neden olduğu karaciğer hasarına karşı silimarinin koruyucu etkisi olduğu da gösterilmiştir.

**Protein sentezini uyarması:** Silimarinin hepatik doku rejenerasyonunu uyarmasını açıklayan birincil mekanizma, hasarlı karaciğerde protein sentezini arttırmasıdır. *In vivo* ve *in vitro* çalışmaların her ikisinde de protein sentezindeki artışa ilaveten ribozom oluşumunda ve DNA sentezinde artış ölçülmüştür (Sonnenbichler ve Zetl 1986, Kaynak: Luper 1998 p.413).

**Antikanser aktivitesi:** Yapılan çalışmalar silimarinin, steroid hormona bağımlı kanser türleri olan servikal ve prostat kanserleri başta olmak üzere, meme, mesane, hepatoma ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerine karşı antikarsinojenik etkileri olduğunu göstermiştir (Zi ve ark. 1998a; Zi ve ark. 1998b; Varghese ve ark. 2005; Gazák ve ark. 2007). Oral silibin ile beslenen SENCAR (=SENsitivity to CARcinogenesis) farelerinde yapılan çalışma ile silibinin kansere karşı güçlü bir koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur (Zhao ve Agarwal 1999).

**Anti-inflamatuvar etkileri:** Yapılan çalışmalar silimarinin mast hücre stabilizasyonunu, nötrofil göçünün inhibisyonunu, Kupffer hücrelerinin inhibisyonunu, lökotrien ve prostoglandin sentezinin inhibisyonunu kapsayan çeşitli anti-inflamatuvar etkileri olduğunu göstermiştir (Fantozzi ve ark. 1986; Dehmlow ve ark. 1996a; Dehmlow ve ark. 1996b; De La Puerta ve ark. 1996).

**Antifibrotik etki:** Hepatik yıldız (stella) hücreleri karaciğer fibrojenezinde önemli patojenik rol oynar. Bazı fibrotik etkilere (kronik alkol tüketimi, CCl<sub>4</sub> vb.) cevap olarak yıldız hücreleri çoğalarak, karaciğerde kollajen fibril birikmesinden sorumlu olan miyofibroblastlara dönüşürler. Silimarinin yıldız hücrelerinin aktivasyonunu azaltarak fibrozu engellediği bildirilmiştir (Fuchs ve ark. 1997).

### **Klinik Çalışmalar**

Silimarin ile yapılan klinik çalışmalar, alkolik karaciğer hastalığı, siroz ve akut viral ve kronik hepatitlerde kullanımına yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar farklı etiyolojilerdeki, örneğin alkolik ve non-alkolik siroz gibi karaciğer bozuklukları hastalarını da içine almaktadır. Ayrıca silimarinin toksin ve ilaçların neden olduğu hepatitlerde, örneğin *Amanita phalloides* mantarının yenmesinin ardından, kullanımıyla ilgi çalışmalar da vardır (Wellington ve Jarvis 2001; Pradhan ve Girish 2006; Barnes ve ark. 2007).

Silimarinin tedavi edici özelliğini araştırmak amacıyla yapılan birçok çalışmada, hastaların karaciğer fonksiyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışmalarda silimarinin karaciğer fonksiyon testleri (transaminazlar, bilirubin vb.)'ne etkisinin oldukça hafif olduğu ve sadece uzun süreli uygulamalarda silimarinin tedavi edici etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca silimarinin alkolik siroz hastalarında hayatta kalma oranlarında iyileştirme gösterdiği saptanmıştır (Bruneton 1999).

## **2.7. *Amaranthus* ve Genel Özellikleri**

*Amaranthus* (amaranth), Amaranthaceae familyasına ait Orta ve Güney Amerika kökenli tek veya çok yıllık otsu bir bitkidir (Davis 1967). *Amaranthus* ismi, Yunanca 'solmayan çiçek' anlamına gelen 'amarantos' kelimesinden türetilmiştir. 60-70 türü bulunan *Amaranthus* yetiştirilme şartlarına ve türlerinin özelliklerine bağlı olarak,

besin maddesi, ilaç, boya, süs bitkisi ve yem olarak dünyanın bir çok bölgesinde kullanılmaktadır (Teutonico ve Knorr 1985).

*Amaranthus*,

- Farklı iklim bölgelerinde, tropikal, subtropikal ve ılıman iklimlerde geniş bir yayılım gösterir.
- Ekolojik esneklik gösterir. Farklı koşullara, kuraklığa ve toprak yetersizliğine kolaylıkla adapte olur. Deniz seviyesinden 2500 m yukarısına kadar uyum sağlayabilir.
- Çok hızlı büyür, yüksek verimliliği vardır (çok fazla tohum oluşturur) ve bitki önemli hastalık formlarına sahip değildir (De Macvean ve Pöll 1997; Cordero-de-los-Santos ve ark. 2005).

*Amaranthus*'un yetiştirilmesi 5000-7000 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu bitkiyi ilk kullananların Maya'lar olduğu ve daha sonra İnka'lar ve Aztek'lerce kullanıldığı bilinmektedir. Yüzyıllarca unutulmuş olan bu bitki 1970'li yıllarda yeniden keşfedilmiştir. Yakın zamanlarda ise *Amaranthus* sadece Meksika ve Orta Amerika'da değil aynı zamanda Güney Amerika'nın Andean bölgesinde (Bolivya, Ekvator, Kolombiya ve Peru) ve bazı Asya, Avrupa ve Afrika ülkelerinde de yetiştirilmeye başlanmıştır (Escudero ve ark. 2004).

*Amaranthus*, yaprakları sebze olarak yenilen ve tohumları tahıl olarak kullanılabilen nadir bitkilerdendir (Teutonico ve Knorr 1985). Yapraklarının tadı ıspanağa benzer ve Meksika, Peru, Hindistan ve pekçok Afrika ve doğu Asya ülkesinde sebze olarak tüketilir. Sıcak yaz aylarında tarlalarda başka yeşil mahsül büyümediği için *Amaranthus* önemli bir besindir (Shukla ve ark. 2006; Grubben 2004). Tohumları, tahıl gibi pişirilir, un haline getirilir veya mısır gibi patlatılarak kullanılır. *Amaranthus* unu Meksika, Amerika ve Hindistanda tek başına veya diğer tahılların unları ile karıştırılarak ekme ve pasta yapımında kullanılır. *Amaranthus* unu düşük gluten (Alvarez-Jubete ve ark. 2009) içeriği nedeniyle Çölyak hastalarının diyetini zenginleştirmek amacıyla kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Pasko ve ark. 2007).

*Amaranthus* besin değeri yüksek bir bitkidir. Tohumları, yüksek oranda (% 15-18) protein ve önemli miktarda lizin ve metiyonin amino asitlerini içerir. Protein

dışında *Amaranthus* besinsel lif, kalsiyum ve demir gibi mineraller bakımından da iyi bir kaynaktır. Diğer tahıllarla kıyaslandığında lizin, diyetsel lif ve mineral içeriği bakımından daha zengindir. Tohumları ayrıca önemli miktarda skualen, antosiyaninler, polifenoller, flavonoidler, tokoferoller ve tokotrienoller içerir. *Amaranthus* tohumları % 6-10 oranında yağ içerir ve bu yağın yaklaşık olarak % 77'sini doymamış yağ asitleri, özellikle linoleik asit oluşturur. *Amaranthus* yaprakları karotenoidler bakımından zengindir ve diyetsel lif içerir. Ayrıca yapraklarının A, C ve B<sub>1</sub> vitaminleri, kalsiyum, demir ve çinko gibi mineraller bakımında da zengin olduğu gösterilmiştir (Grubben 2004; Thomas 2005; Shukla ve ark. 2006; Janick ve Whipkey 2007).

Halk arasında gerek yüksek besin değeri nedeniyle yiyecek olarak, gerekse tıbbi amaçlarla yaygın bir etnobotanik kullanımı olan *Amaranthus* türlerinin tedavi değerlerinin olup olmadığı son yıllarda yapılan bir çok çalışmaya konu olmuştur.

Çeşitli *Amaranthus* türlerinin (*A. hypochondriacus*, *A. caudatus*, *A. esculentus*) tohumlarının hiperkolesterolemi oluşturulmuş hayvanlardaki etkisi incelendiğinde trigliserid, total kolestrol, LDL- ve VLDL-kolesterol düzeylerinin kontrole göre azaldığı ve HDL-kolesterol düzeylerinde ise anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (Chaturvedi ve ark. 1993; Plate ve Areas 2002; Czerwinski ve ark. 2004). Streptozotosin (STZ) ile diabet oluşturulan sıçanlarda artmış lipit düzeylerini *A. esculentus* tohumlarının azalttığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 2006a) *Amaranthus* tohumlarının kolesterol düzeylerini azaltıcı etkisi nedeniyle koroner kalp hastalığını önlemek amacıyla kullanılabileceğini ileri sürülmüştür (Plate ve Areas 2002).

*Amaranthus* tohumlarının (Kim ve ark. 2006b) ve yapraklı gövdenin (Sangameswaran ve Jayakar 2008) STZ-diabetik sıçanlarda anti-diyabetik etki gösterdiği bulunmuştur.

*A. gangeticus* ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, karaciğer ve meme kanseri hücre serisinin çoğalmasını ve kanser oluşturulmuş sıçanlarda tümör belirteçlerinin aktivitesini inhibe ettiği bulunmuş ve bitkinin antikanser potansiyelinin olduğu ileri sürülmüştür (Sani ve ark. 2004).

*A. spinosus* yaprak ekstresinin farklı yöntemlerle anti-inflamatuvar aktivitesi incelendiğinde, bitkinin anti-inflamatuvar etkisini prostaglandin biyosentezini inhibe ederek gösterdiği ileri sürülmüştür (Olajide ve ark. 2004).

Amin ve ark. (2006) halk arasında sebze olarak kullanılan farklı amaranth türlerinin (*A. paniculatus*, *A. gangeticus*, *A. blitum* ve *A. viridis*) antioksidan aktivitelerini (total antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktivite) ve total fenolik içeriklerini inceledikleri çalışmalarında, dört farklı türün farklı antioksidan aktivite ve total fenolik içeriğe sahip olduklarını bulmuşlardır.

Yüksek besin değerine sahip olduğu bildirilen farklı *Amaranthus* türlerine ait tohumların (*A. paniculatus*, *A. caudatus*, *A. cruentus* ve *A. hypocondriacus*) *in vitro* antioksidan aktiviteleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş ve *Amaranthus* tohumlarının doğal antioksidan aktiviteye sahip değerli bir kaynak olduğu ileri sürülmüştür (Klimczak ve ark. 2002; Conforti ve ark. 2005; Pasko ve ark. 2007; Nsimba ve ark. 2008).

Bazı *Amaranthus* türlerinin (*A. gangeticus* Linn. ve *A. spinosus*) dimetil hidrazin (Anilakumar ve ark. 2004), heksaklorosikloheksan (Anilakumar ve ark. 2006) ve karbon tetroklorür (Zeashan ve ark. 2008) gibi farklı kimyasal maddelerle karaciğer hasarı oluşturulmuş deney hayvanları üzerine antioksidan ve karaciğer koruyucu etkiler gösterdiği bulunmuştur.

Ülkemizde doğal olarak yetişen yaklaşık 13 *Amaranthus* türü bulunmaktadır: *A. retroflexus* L., *A. chlorostachys* Willd., *A. hybridus* L., *A. viridis* L., *A. deflexus* L., *A. lividus* L., *A. blitoides* S. Wats., *A. albus* L., *A. graecizans* L., *A. cruentus* L., *A. hypochandriocus* L., *A. emarginatus* Uline&Bray, *A. spinosus* L. (Davis 1967; Güner ve ark. 2000; Özhatay ve Kültür 2006).

*Amaranthus lividus* L. (syn=*Amaranthus blitum* L.) (Şekil 2-13) ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesinde darı mancarı olarak bilinen ve halk arasında yiyecek olarak kullanılan bir bitkidir. *Amaranthus* türleri için Baytop (1994), tilki kuyruğu, hoşkuran, ohraşan ve hoşmerik gibi farklı yöresel isimlerin kullanıldığını ve bitkinin bir yıllık otsu bir bitki olduğunu ve çiçekli dallarının ıspanak gibi pişirilerek sebze olarak kullanıldığını bildirmektedir.



**Şekil 2-13: *Amaranthus lividus* L.**

<http://www.guenther-blaich.de/pflseite.php?par=Amaranthus+blitum>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullandığımız tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) [Aldrich 13863-0]

5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) [Sigma D8130]

Albumin (BSA) [Fluka 05470]

Aseton [Merck 100014]

Bakır sülfat [Merck 102787]

Brom [Merck 101945]

Dietanolamin [Sigma D8885]

Dipotasyum hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) [Merck 105101]

Disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) [Riedel de Haën 4272]

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) [Sigma E5134]

Fenil asetat [Aldrich 108723]

Gliserol [Merck 104093]

Glutatyon (GSH) [Fluka 49750]

Glutatyon (GSSG) [Sigma G4376]

Glutatyon redüktaz (GSH-R) [Sigma G3664]

Heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) [Sigma H9151]

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) [Riedel de Haën 18312]

Hidroklorik asit (HCl) [Merck 100314]

Kafein [Sigma C8960]

Kalsiyum klorür [Merck 2380]

Karboksimetilselüloz (CMC) [Fluka 21902]

Laktat dehidrojenaz (LDH) [Sigma L2500]

L-Alanin [Merck 101007]  
L-Aspartat [Merck 100129]  
Magnezyum klorür [Merck 105832]  
Malat dehidrojenaz (MDH) [Sigma M2634]  
Metafosforik asit [Merck 100546]  
o-Dianizidin [Sigma D3252]  
o-Fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) [Merck 100563]  
Paraokson [Sigma D9286]  
Piridoksal fosfat [Fluka 82870]  
p-Nitrofenil fosfat (pNPP) [Sigma N3254]  
Potasyum bikromat [Merck 104862]  
Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) [Merck 104871]  
Riboflavin [Merck 7609]  
Silimarin [Sigma S0292]  
Sodyum azid [Merck 106688]  
Sodyum benzoat [Aldrich 109169]  
Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) [Riedel de Haën 06203]  
Sodyum karbonat [Merck 106398]  
Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ) [Riedel de Haën 13423]  
Sodyum molibdat [Merck 106521]  
Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) [Merck 106544]  
Sodyum sitrat [Merck 106432]  
Sodyum tungstat [Merck 106672]  
Sodyum-potasyum tartarat (Na-K tartarat) [Merck 108085]  
Sülfanilamid [Sigma S9251]  
Sülfanilik asit [Merck 100685]

Süperoksit dismutaz (SOD) [Sigma S2515]

Tiyobarbiturik asit (TBA) [Merck 108180]

Trikloroasetik asit (TCA) [Merck 100810]

Tris(hidroksimetil)aminometan [Sigma T6066]

$\alpha$ -Ketoglutarat [Fluka 75893]

$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş) (NADH) [Fluka 43420]

$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(indirgenmiş) (NADPH) [Sigma N1630]

### **3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**

Buz makinası (Eurofrigor)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (- 20°C) (Bosch)

Derin dondurucu (- 80°C) (NUAIRE NU 6510E)

Distile su cihazı (Labconco)

Etüv (Memmert UM 500)

Hassas terazi (AND HM 200)

Homojenizatör (Art-MICCRA D-1)

Manyetik karıştırıcı (Janke & Kunkel KG)

Otomatik pipetler (Eppendorf)

pH metre (Radiometer PHM 92)

Rotaevaporatör (Buchi R 210)

Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)

Sonikatör (Bandelin UW 2200)

Spektrofotometre (Shimadzu UV 1800)

Su banyosu (100°C) (Kermanlar)

Su banyosu (25-37°C) (Nüve BS 302)

UV lamba

Vorteks (Velp scientifica)

### 3.3. Kullanılan Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 16.07.2007 tarihli ve 18527 sayılı izni ile yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılmak üzere, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilen, 180-280 g ağırlığındaki, 2,5-3 aylık, 43 adet Wistar albino türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlara İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, deney öncesi laboratuvar koşullarına alıştırmak amacıyla, 1 haftalık süre ile 20°C±2, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık periyodu uygulandı.

Hayvanlar deney süresince, normal pellet tipi sıçan yemi ve taze musluk suyu ile beslenerek kontrollü laboratuvar şartlarında, kafeslerinde muhafaza edildiler.

Sıçanlar 7 gruba ayrıldı:

- |  |       |
|--|-------|
| 1. Kontrol Grubu   | (n=5) |
| 2. Kontrol+A. <i>lividus</i> (500 mg/kg) Grubu           | (n=5) |
| 3. Kontrol+Silimarin Grubu                               | (n=5) |
| 4. CCl <sub>4</sub> Grubu                                | (n=7) |
| 5. CCl <sub>4</sub> +A. <i>lividus</i> (250 mg/kg) Grubu | (n=7) |
| 6. CCl <sub>4</sub> +A. <i>lividus</i> (500 mg/kg) Grubu | (n=7) |
| 7. CCl <sub>4</sub> +Silimarin Grubu                     | (n=5) |

### 3.4. Deney Protokolünün Uygulanması

#### 3.4.1. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *Amaranthus lividus* L. bitkisi 2008 yılının Temmuz ve Ağustos aylarında Bartın ilinden temin edildi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

emekli öğretim üyesi Prof.Dr. Asuman Baytop tarafından teşhisi yapılan *A. lividus* L. numunesi İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda 83401 numara ile kayıtlıdır.

*A. lividus* bitkisinin toprak üstü kısımları (yapraklı ve çiçekli dalları) yıkandıktan sonra gölgede kurutuldu.

### 3.4.2. *Amaranthus lividus* Sulu Ekstresinin Hazırlanması

Gölgede kurutulmuş ve ufak parçalara ayrılmış olan 100 g *A. lividus* 1 L distile su ile 30 dakika kaynatıldı ve soğuduktan sonra tülbentten süzülde. Süzüntünün rotaevaporatörde 40-50°C'lerde vakum altında suyunun uçurulması ile koyu kahve renkli 26 g bitki ekstresi elde edildi. Bitki ekstresi kullanılacağı zamana kadar derin dondurucuda -20°C'de saklandı.

### 3.4.3. Karaciğer Hasarı Oluşturulması

Çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturulmak üzere kullanılan CCl<sub>4</sub>, % 50 (v/v) olacak şekilde zeytinyağı ile karıştırılarak hazırlandı.

Karaciğeri koruyucu etkisi olduğu bilinen silimarin çalışmamızda standart olarak kullanıldı. Silimarinin suda çözünürlüğü düşük olduğu için, silimarin çözeltisi ve bitki ekstresi % 1'lik karboksimetilselüloz (CMC) ile çözülerek her gün taze hazırlandı.

Tüm uygulamalar sıçanlar hafif eter anestezisi altındayken yapıldı.

Gruplar bazal diyetle ek olarak verilen maddelerle aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1. **Kontrol Grubu:** 9 gün boyunca her gün CMC (4 ml/kg p.o.) ve 10. gün zeytinyağı (1,5 mL/kg i.p.)
2. **Kontrol+A. lividus Grubu:** 9 gün boyunca her gün *A. lividus* ekstresi (500 mg/kg p.o.) ve 10. gün zeytinyağı (1,5 mL/kg i.p.)
3. **Kontrol+Silimarin Grubu:** 9 gün boyunca her gün silimarin (50 mg/kg p.o.) ve 10. gün zeytinyağı (1,5 mL/kg i.p.)
4. **CCl<sub>4</sub> Grubu:** 9 gün boyunca her gün CMC (4 ml/kg p.o.) ve 10. gün CCl<sub>4</sub> (1,5 mL/kg i.p.)
5. **CCl<sub>4</sub>+ A. lividus Grubu:** 9 gün boyunca her gün *A. lividus* ekstresi (250 mg/kg p.o.) ve 10. gün CCl<sub>4</sub> (1,5 mL/kg i.p.)

6. **CCl<sub>4</sub>+ *A. lividus* Grubu:** 9 gün boyunca her gün *A. lividus* ekstresi (500 mg/kg p.o.) ve 10. gün CCl<sub>4</sub> (1,5 mL/kg i.p.)
7. **CCl<sub>4</sub>+Silimarin Grubu:** 9 gün boyunca her gün silimarin (50 mg/kg p.o.) 10. gün CCl<sub>4</sub> (1,5 mL/kg i.p.)

#### 3.4.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Son CCl<sub>4</sub> uygulamasından 24 saat sonra (11. gün), bütün gruplardaki sıçanların kanları hafif eter anestezisi altında enjektör ile sağ ventriküle girilerek alındı ve daha sonra karaciğer dokuları çıkarıldı.

Alınan kanlar 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi ve serumları ayrıldı. Serumlar ayrı ayrı eppendorf tüplere bölünerek -80°C'de saklandı. Karaciğer dokuları iki kez % 0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra, % 0,9'luk NaCl içinde, -80°C'de saklandı.

**Serumda yapılan incelemeler:** Serumda alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalen fosfataz, paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri ile bilirubin miktarı tayin edildi.

**Karaciğer analizleri:** Karaciğer dokusundan hazırlanan % 10'luk (w/v) homojenatta malondialdehit ve glutatyon tayinleri yapıldı. Bu homojenattan elde edilen postmitokondriyal fraksiyonda; katalaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri ile protein miktarı tayin edildi. Miyeloperoksidaz aktivitesi karaciğer dokusundan farklı bir yöntemle hazırlanan % 10'luk (w/v) homojenatta tayin edildi.

Serum ve karaciğer dokusunda yapılan bütün biyokimyasal analizler İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında Nisan 2009-Mart 2010 tarihleri arasında yapıldı.

#### 3.4.5. Karaciğer Doku Homojenatının Hazırlanması

##### Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (5 mM, pH 7,4):** a) 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve b) 0,87 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılıp ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 1 L'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 1/4 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7,4'e ayarlandı.

- **Homojenizasyon tamponu [NaCl (0,15 M) içeren fosfat tamponu]:** 8,7 g NaCl fosfat tamponu ile çözülerek 1 L'ye tamamlandı.

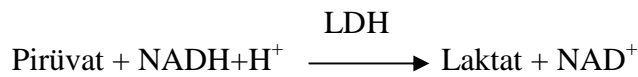
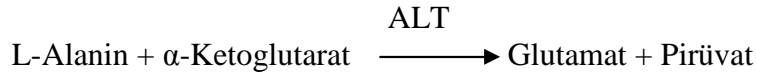
Homojenat hazırlanırken karaciğer dokusu süzgeç kağıdı ile kurutuldu ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılarak 1 g tartıldı. Tartılan dokunun üzerine 10 mL homojenizasyon tamponu ilave edildi ve homojenizatör ile 14.500 devir/dakika'da 20 saniye homojenize edilerek % 10'luk (w/v) karaciğer dokusu homojenatı hazırlandı.

Homojenatın 13.000 rpm'de, +4°C'de, 5 dakika santrifüje edilmesi ile postmitokondriyal fraksiyon elde edildi.

### 3.5. Araştırılan Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri

#### 3.5.1. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin Tayini

ALT, bir amino grubunu glutamat ve pirüvat oluşturmak üzere  $\alpha$ -ketoglutarata aktaran enzimdir. Bu reaksiyon sonucu oluşan pirüvat, laktat dehidrojenaz (LDH) ve NADH ile laktata indirgenir. Yöntemin esası, NADH konsantrasyonundaki azalmanın ölçülmesidir (Bergmeyer 1980).



#### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (1 M):** Yoğunluğu 1,19 g/mL olan % 37'lik HCl'den 83 mL alınarak distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- **HCl çözeltisi (110 mM) (a):** 11 mL 1 M HCl çözeltisinden alınarak distile su ile 100 mL'ye seyreltildi.
- **Tris çözeltisi (110 mM) (b):** 1,33 g tris distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

- **Tris – HCl tamponu (110 mM, pH 7,5):** 38 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak pH 7,5'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **Tris (110 mM) – L-alanin (630 mM) çözeltisi:** 1,33 g tris ve 5,61 g L-alanin 80 mL distile su ile çözüldü ve pH'sı 1 M HCl ile 7,5'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- **Piridoksal fosfat çözeltisi (6,3 mM):** 16,7 mg piridoksal fosfat 10 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.
- **NADH çözeltisi (11,3 mM):** 8 mg NADH 1 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.
- **NaOH çözeltisi (1 N):** 40 g NaOH distile su ile çözülerek 1 L'ye tamamlandı.
- **$\alpha$ -Ketoglutarat çözeltisi (180 mM):** 0,3 g  $\alpha$ -ketoglutarat-monosodyum tuzu bir miktar tris-HCl tamponunda çözüldü, pH'sı 7,5'e 1 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlandı.
- **Gliserol-su karışımı (1:1, v:v):** 5 mL gliserol 5 mL su ile karıştırılarak kullanıldı.
- **LDH solüsyonu (151 U/mL):** LDH (2,04 mL, 25 KU) gliserol-su karışımı ile 81 kez seyreltilerek kullanıldı.
- **Potasyum bikromat çözeltisi (% 0,03 g):** 0,03 g  $K_2Cr_2O_7$  distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

### Deneyin Yapılışı

Reaksiyon karışımı: 50 mL tris-alanin çözeltisi, 1 mL piridoksal fosfat çözeltisi, 1 mL NADH çözeltisi ve 0,5 mL LDH solüsyonu karıştırıldı.

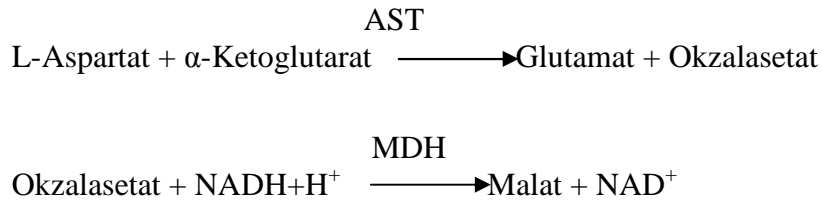
1 mL reaksiyon karışımı ve 100  $\mu$ L serum 15 dakika 37°C'de inkübe edildi ve bu karışıma 100  $\mu$ L  $\alpha$ -ketoglutarat çözeltisi ilave edilerek absorbansdaki azalma köre karşı 37°C'de, 5 dakika boyunca 340 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı. Kör olarak potasyum bikromat çözeltisi, absorbansı 340 nm'de 0,7-0,9 olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

## Hesaplama

Her bir örnek için ALT aktivitesi, bu deneyde NADH için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/L olarak hesaplandı. 1 ünite ALT, dakikada 1  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -ketoglutaratın glutamata dönüşümünü kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.2. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin Tayini

AST, bir amino grubunu glutamat ve okzalasetat oluşturmak üzere  $\alpha$ -ketoglutarata aktaran enzimdir. Bu reaksiyon sonucu oluşan okzalasetat, malat dehidrojenaz (MDH) ve NADH ile malata indirgenir. Yöntemin esası, NADH konsantrasyonundaki azalmanın ölçülmesidir (Bergmeyer ve ark. 1986).



### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (97 mM) (a):** 9,7 mL 1M HCl çözeltisinden alınarak distile su ile 100 mL'ye seyreltildi.
- **Tris çözeltisi (97 mM) (b):** 1,17 g tris distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Tris – HCl tamponu (97 mM, pH 7,8):** 34 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak pH'sı 7,8'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **NaOH çözeltisi (5 N):** 20 g NaOH distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Tris (97 mM) – L-aspartat (302 mM) çözeltisi:** 1,17 g tris ve 4,02 g L-aspartat 80 mL distile su ile çözüldü ve pH'sı 5 N NaOH ile 7,8'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.

- **Piridoksal fosfat çözeltisi (6,3 mM):** 16,7 mg piridoksal fosfat 10 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.
- **NADH çözeltisi (11,3 mM):** 8 mg NADH 1 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.
- **$\alpha$ -Ketoglutarat çözeltisi (144 mM):** 0,242 g  $\alpha$ -ketoglutarat-monosodyum tuzu bir miktar tris-HCl tamponunda çözüldü, pH'sı 7,8'e 1 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 10 mL'ye tamamlandı.
- **LDH solüsyonu (226 U/mL):** LDH (2,04 mL, 25 KU) gliserol-su karışımı ile 54 kez seyreltilerek kullanıldı.
- **MDH solüsyonu (151 U/mL):** MDH (1 mL, 500 U) gliserol-su karışımı ile 33 kez seyreltilerek kullanıldı.
- **LDH-MDH solüsyonu:** 0,25 mL LDH solüsyonu ile 0,25 mL MDH solüsyonu karıştırılarak kullanıldı.

### Deneyin Yapılışı

Reaksiyon karışımı: 50 mL tris-aspartat çözeltisi, 1 mL piridoksal fosfat çözeltisi, 1 mL NADH çözeltisi ve 0,5 mL LDH-MDH solüsyonu karıştırıldı.

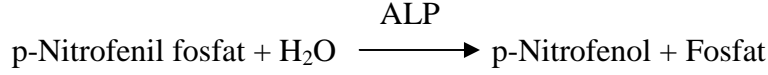
1 mL reaksiyon karışımı ve 100  $\mu$ L serum 37°C'de 15 dakika inkübe edildi ve bu karışıma 100  $\mu$ L  $\alpha$ -ketoglutarat çözeltisi ilave edilerek absorbansdaki azalma köre karşı 37°C'de, 5 dakika boyunca 340 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı. Kör olarak potasyum bikromat çözeltisi, absorbansı 340 nm'de 0,7-0,9 olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

### Hesaplama

Her bir örnek için AST aktivitesi, bu deneyde NADH için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/L olarak hesaplandı. 1 ünite AST, dakikada 1  $\mu$ mol  $\alpha$ -ketoglutaratın glutamata dönüşümünü kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.3. Serumda Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil fosfat (pNPP)'in ALP ile hidrolizi sonucunda açığa çıkan p-nitrofenol absorbansının ölçülmesidir (Walter ve Schült 1974).



#### Kullanılan Çözeltiler

- **Dietanolamin (1,15 M) – magnezyum klorür (0,575 mM) tamponu (pH 9,8):** 12 g dietanolamin ve 11,7 mg MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ayrı ayrı bir miktar distile su ile çözüldü ve karıştırılarak pH'sı 1 M HCl ile 9,8'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- **p-Nitrofenil fosfat (pNPP) çözeltisi (0,1 M):** 0,46 g pNPP distile su ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

#### Deneyin Yapılışı

Örnek küvetine 2,6 mL, kör küvetine 2,7 mL tampon çözeltisi ve her ikisine de 0,3 mL pNPP çözeltisi ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda örnek küvetine 100 µL serum ilave edilerek örnek absorbansındaki artış, köre karşı 37°C'de, 5 dakika boyunca 405 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

#### Hesaplama

Her bir örnek için ALP aktivitesi, bu deneyde p-nitrofenol için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $18,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/L olarak hesaplandı. 1 ünite ALP, dakikada 1 µmol pNPP'in hidrolizini kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.4. Serumda Total Bilirubin Miktarının Tayini

Bilirubin, kafein varlığında diazolandırılmış sülfanilik asit ile bağlanarak renkli azobilirubin oluşturur. Yöntemin esası, oluşan renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir (Jendrassik ve Gróf 1938).

#### Kullanılan Çözeltiler

- **Sülfanilik asit (29 mM) – HCl (180 mM) çözeltisi:** 0,5 g sülfanilik asit 70 mL distile su ile çözüldükten sonra 1,5 mL derişik HCl ilave edilerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **NaNO<sub>2</sub> çözeltisi (25 mM):** 0,172 g NaNO<sub>2</sub> distile su ile çözümlenerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Kafein (260 mM) – sodyum benzoat (520 mM) çözeltisi:** 7,49 g sodyum benzoat ve 5 g kafein distile su ile çözümlenerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Na-K tartarat (930 mM) – NaOH (1,9 M) çözeltisi:** 26,2 g Na-K tartarat ve 7,6 g NaOH distile su ile çözümlenerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Derişik HCl:** Yoğunluğu 1,19 g/mL olan % 37'lik HCl orijinal şişesinden alınarak kullanıldı.

#### Deneyin Yapılışı

Örnek tüpüne 25 µL NaNO<sub>2</sub> çözeltisi konulduktan sonra örnek ve kör tüplerine 100 µL sülfanilik asit-HCl çözeltisi, 500 µL kafein-benzoat çözeltisi ve 100 µL serum ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda, örnek ve kör tüplerine 500 µL Na-K tartarat-NaOH çözeltisi eklendi ve 10 dakika daha oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin bitiminde örnek absorbansı köre karşı 578 nm'de ölçüldü.

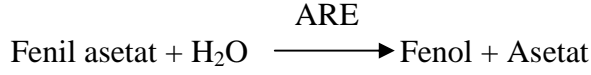
#### Hesaplama

Serum bilirubin miktarı aşağıdaki formül kullanılarak mg/dL olarak ifade edildi.

$$\text{Total bilirubin} = A_{578 \text{ nm}} \times 10,8$$

### 3.5.5. Serumda Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, substrat olarak kullanılan fenil asetatın ARE tarafından hidrolizi sonucu oluşan fenol miktarının ölçülmesidir (Gan ve ark. 1991).



#### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (20 mM) (a):** 2 mL 1M HCl çözeltisi distile su ile 100 mL'ye seyreltildi.
- **Tris çözeltisi (20 mM) (b):** 0,24 g tris distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Tris – HCl tamponu (20 mM, pH 8):** 29 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **Çalışma ayıracı [kalsiyum klorür (0,9 mM) - fenil asetat (1mM)]:** 13,2 mg kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) bir miktar tris-HCl tamponu ile çözüldü ve 12,6  $\mu\text{L}$  fenil asetat ilave edildikten sonra tris-HCl tamponu ile 100 mL'ye tamamlanarak, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kuvvetlice karıştırıldı.

#### Deneyin Yapılışı

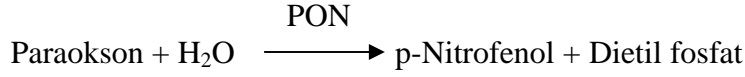
Örnek ve kör küvetlerine 1,5 mL çalışma ayıracı konulduktan sonra, kör küvetine 10  $\mu\text{L}$  distile su ve örnek küvetine 10  $\mu\text{L}$  serum ilave edilerek, örnek absorbansındaki artış köre karşı, 25°C'de, 2 dakika boyunca 270 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

#### Hesaplama

Her bir örnek için ARE aktivitesi, bu deneyde fenol için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/L olarak hesaplandı. 1 ünite ARE, dakikada 1  $\mu\text{mol}$  fenol oluşumunu kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.6. Serumda Paraoksonaz (PON) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, substrat olarak kullanılan paraoksonun (o,o-dietil-o-p-nitrofenilfosfat) PON tarafından hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol miktarının ölçülmesidir (Juretić ve ark. 2001).



#### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (0,1 M) (a):** 10 mL 1 M HCl çözeltisi distile su ile 100 mL'ye seyreltildi.
- **Tris çözeltisi (0,1 M) (b):** 1,21 g tris distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Tris – HCl tamponu (20 mM, pH 8):** 29 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- **Çalışma ayıracı [kalsiyum klorür (2 mM)-NaCl (1 M)-paraokson (2 mM)]:** 29,4 mg kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 5,84 g NaCl bir miktar tris-HCl tamponu ile çözüldü ve bu karışıma 1,5 mL asetonda çözülen 43 µL paraokson eklenerek tris-HCl tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Aseton :** Orijinal çözeltiden alınarak kullanıldı.

#### Deneyin Yapılışı:

Örnek ve kör küvetlerine 1,4 mL çalışma ayıracı konulduktan sonra, kör küvetine 40 µL distile su ve örnek küvetine 40 µL serum ilave edilerek, örnek absorbansındaki artış köre karşı, 37°C'de, 2 dakika boyunca 405 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

#### Hesaplama

Her bir örnek için PON aktivitesi, bu deneyde p-nitrofenol için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $17,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne

alınarak, ünite/L protein olarak hesaplandı. 1 ünite PON, dakikada 1  $\mu$ mol p-nitrofenol oluşumunu kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.7. Karaciğerde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Tayini

Yöntemin esası, LPO ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan rengin absorbansının ölçülmesidir (Buege ve Aust 1978).

#### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (0,25 N):** 25 mL 1 M HCl çözeltisinden alınarak distile su ile 100 mL'ye seyreltildi.
- **Trikloroasetik asit (TCA) (% 15 g) – TBA (% 0,375 g) çözeltisi:** 15 g TCA ve 0,375 g TBA HCl çözeltisi ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

#### Deneyin Yapılışı

Örnek tüpüne 0,5 mL karaciğer homojenatı ve 0,5 mL homojenizasyon tamponu, kör tüpüne 1 mL homojenizasyon tamponu ve her iki tüpe de 2 mL TCA-TBA çözeltisi ilave edildikten sonra, 20 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Kaynar su banyosundan alınan tüpler soğutulularak 4000 rpm'de, 10 dakika santrifüje edildi ve süpernatantlar alınarak örnek absorbansı köre karşı, 532 nm'de ölçüldü.

#### Hesaplama

Her bir örnek için LPO düzeyi, bu deneyde MDA için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak, nmol MDA/g doku cinsinden hesaplandı.

### 3.5.8. Karaciğerde Glutatyon (GSH) Miktarının Tayini

Yöntemin esası, sülfidril gruplarının 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'in oluşturduğu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir (Beutler ve ark. 1963).

### Kullanılan Çözeltiler

- **Sodyum sitrat çözeltisi (% 1 g):** 1 g sodyum sitrat distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Ellman ayıracı (% 40 mg DTNB):** 40 mg DTNB sodyum sitrat çözeltisi ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Proteinsizleştirme çözeltisi:** 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA ve 30 g NaCl distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi (0,3 M):** 5,34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O distile su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

### Deneyin Yapılışı

Bir santrifüj tüpüne 0,5 mL homojenat, 1,5 mL homojenizasyon tamponu ve 3 mL proteinsizleştirme çözeltisi konulup karıştırıldıktan sonra, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Süpernatant GSH miktar tayininde kullanıldı.

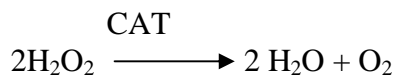
Örnek tüpüne 0,5 mL süpernatant ve kör tüpüne 0,5 mL homojenizasyon tamponu konulduktan sonra, her iki tüpe de 2 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi ve 0,5 mL Ellman ayıracı ilave edilerek, örnek absorbansı köre karşı 412 nm'de ölçüldü.

### Hesaplama

Her bir örnek için GSH düzeyi, bu deneyde TNB için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak,  $\mu\text{mol GSH/g doku}$  cinsinden hesaplandı.

### 3.5.9. Karaciğerde Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, katalaz tarafından yıkılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oranının ölçülmesidir (Aebi 1974).



### Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH 7):** a) 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve b) 0,89 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 1/1,55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı.
- **$\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (20 mM):** Yoğunluğu 1,11 g/mL olan % 30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 0,2 mL alınıp fosfat tamponu ile 100 mL'ye seyreltildi.

### Deneyin Yapılışı

Örnek küvetine 1980  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu ve 20  $\mu\text{L}$  postmitokondriyal fraksiyon ilave edildikten sonra, 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi eklenerek örnek absorbansındaki azalma fosfat tamponuna karşı, 25°C'de, 1 dakika boyunca 240 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

### Hesaplama

Her bir örnek için CAT aktivitesi, bu deneyde peroksit için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/mg protein olarak hesaplandı. 1 ünite CAT, dakikada 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in yıkılmasını kataliz eden enzim miktarıdır.

#### 3.5.10. Karaciğerde Glutatyon-S-transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, substrat olarak kullanılan 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) glutatyonla (GSH) oluşturduğu bileşiğin absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesidir (Habig ve Jacoby 1981).



### Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (107,5 mM, pH 6,5):** a) 1,46 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve b) 1,87 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 7/3 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 6,5'a ayarlandı.
- **Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li fosfat tamponu (1,075 mM):** 0,04 g  $\text{EDTA.Na}_2.2\text{H}_2\text{O}$  fosfat tamponu ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **GSH çözeltisi (30 mM):** 92 mg GSH 10 mL EDTA'lı fosfat tamponunda çözüldü.
- **CDNB çözeltisi (30 mM):** 60 mg CDNB 10 mL etanolde çözüldü.
- **Etanol (% 96):** Orijinal çözeltilerden alınarak kullanıldı.

### Deneyin Yapılışı

Örnek küvetine 2,7 mL, kör küvetine 2,8 mL EDTA'lı fosfat tamponu ve her ikisine de sırasıyla 0,1 mL GSH çözeltisi ve 0,1 mL CDNB çözeltisi eklendi. Daha sonra örnek küvetine 0,1 mL postmitokondriyal fraksiyon ilave edilerek, örnek absorbansındaki artış köre karşı, 25°C'de, 3 dakika boyunca 340 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

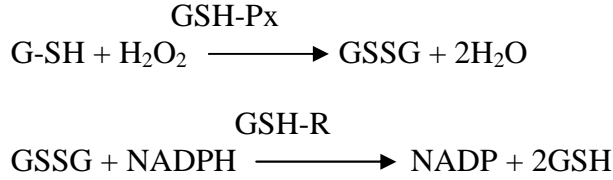
### Hesaplama

Her bir örnek için GST aktivitesi, bu deneyde glutatyon-2,4-dinitrobenzen için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/mg protein olarak hesaplandı. 1 ünite GSH, dakikada 1 nmol glutatyon-2,4-dinitrobenzen oluşumunu kataliz eden enzim miktarıdır.

#### 3.5.11. Karaciğerde Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Tayini

GSH-Px aktivitesi ölçümünde, glutatyon redüktaz (GSH-R) ile birlikte çift enzim sistemi kullanıldı. Yöntemin esası, birinci basamakta GSH-Px aktivitesi sonucu

oluşan okside glutatyonun (GSSG) ikinci basamakta GSH-R tarafından indirgenmesi ve bu indirgenme sırasında yükseltgenen NADPH'nın absorbansta meydana getirdiği azalmanın ölçülmesidir (Lawrence ve Burk 1976).



### Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH 7):** a) 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve b) 0,87 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 4/6 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı
- **EDTA çözeltisi (20 mM):** 0,37 g  $\text{EDTA.Na}_2.2\text{H}_2\text{O}$  fosfat tamponu ile çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.
- **Sodyum azid çözeltisi (20 mM):** 0,065 g sodyum azid fosfat tamponu ile çözülerek 50 mL'ye tamamlandı.
- **NADPH çözeltisi (2 mM):** 8,2 mg NADPH 5 mL fosfat tamponu ile çözüldü.
- **GSH çözeltisi (20 mM):** 15,3 mg GSH 2,5 mL fosfat tamponu ile çözüldü.
- **GSH-R solüsyonu (20 U/mL):** GSH-R (1,13 mL, 500 U) fosfat tamponu ile 22 kez seyreltilerek hazırlandı.
- **$\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (2,5 mM):** Yoğunluğu 1,11 g/mL olan % 30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 64  $\mu\text{L}$  alınıp fosfat tamponu ile 250 mL'ye seyreltildi.

### Deneyin Yapılışı

Örnek küvetine 100  $\mu\text{L}$  postmitokondriyal fraksiyon ve 500  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu, kör küvetine 800  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu ve her ikisine de sırasıyla 50  $\mu\text{L}$  EDTA çözeltisi, 50  $\mu\text{L}$  GSH çözeltisi, 50  $\mu\text{L}$  sodyum azid çözeltisi ve 50  $\mu\text{L}$  GSH-R solüsyonu ilave edilerek 25°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda örnek küvetine 100  $\mu\text{L}$  NADPH çözeltisi ilave edilerek 3 dakika bekletildikten sonra, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

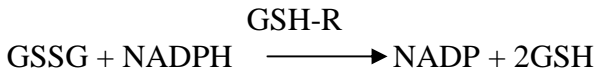
çözeltisi eklenerek örnek absorbansındaki azalma köre karşı, 25°C’de, 2 dakika boyunca 340 nm’de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

### Hesaplama

Her bir örnek için GSH-Px aktivitesi, bu deneyde NADPH için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/mg protein olarak hesaplandı. 1 ünite GSH-Px, dakikada 1 nmol NADPH’nın yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.12. Karaciğerde Glutatyon Redüktaz (GSH-R) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, okside glutatyonun (GSSG) GSH-R ile indirgenmesi sırasında yükseltgenen NADPH oranının hesaplanmasıdır (Carlberg ve Mannervik 1977).



### Kullanılan Çözeltiler

- **HCl çözeltisi (51,6 mM) (a):** 5,16 mL 1 M HCl çözeltisi distile su ile 100 mL’ye seyreltili.
- **Tris çözeltisi (51,6 mM) (b):** 0,62 g tris distile su ile çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- **Tris-HCl Tamponu (51,6 mM, pH 8):** 29 mL a çözeltisi ile 50 mL b çözeltisi karıştırıldı ve pH 8’e ayarlandıktan sonra distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.
- **EDTA (1,035 mM)’lı fosfat tamponu:** 38 mg EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O tris-HCl tamponu ile çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- **NADPH çözeltisi (2 mM):** 4 mg NADPH 2,5 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.
- **GSSG çözeltisi (20 mM):** 31 mg GSSG 2,5 mL tris-HCl tamponu ile çözüldü.

### Deneyin Yapılışı

Örnek küvetine 870  $\mu\text{L}$  ve kör küvetine 900  $\mu\text{L}$  EDTA'lı fosfat tamponu ve her ikisine de 50  $\mu\text{L}$  GSSG çözeltisi ve 50  $\mu\text{L}$  NADPH çözeltisi ilave edildi. Daha sonra örnek küvetine 30  $\mu\text{L}$  postmitokondriyal fraksiyon eklenerek, örnek absorbansındaki azalma köre karşı 25°C'de, 2 dakika boyunca 340 nm'de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

### Hesaplama

Her bir örnek için GSH-R aktivitesi, bu deneyde NADPH için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/mg protein olarak hesaplandı. 1 ünite GSH-R, dakikada 1 nmol NADPH'nın yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.13. Karaciğerde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dönüşür ve oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile o-dianisidinin reaksiyona girmesi ile meydana gelen renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Myrloie ve ark. 1986).

### Kullanılan Çözeltiler

- **Fosfat tamponu (50 mM, pH 7,8):** a) 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve b) 0,87 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 1/9 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7,8'e ayarlandı.
- **EDTA'lı (0,1 mM) fosfat tamponu:** 3.7 mg EDTA fosfat tamponu (50 mM) ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.
- **Fosfat tamponu (10 mM, pH 7,5):** a) 0,136 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve b) 0,174 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 1/4 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7,5'e ayarlandı.

- **Riboflavin çözeltisi (0.2 mM):** 7,5 mg riboflavin fosfat tamponu (10 mM) ile çözülerek 100 mL tamamlandı.
- **o-dianisidin çözeltisi (6 mM):** 19 mg o-dianisidin 10 mL distile su ile çözüldü.
- **SOD standardı (100 IU/mL):** Liyofilize SOD standardı 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile çözüldü. Daha sonra bu stok standarttan uygun hacimler alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

### Deneyin Yapılışı

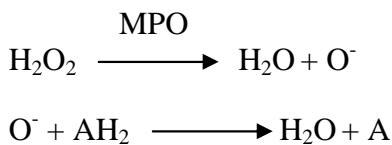
Kör, standart ve örnek tüplerine 2,6 mL fosfat tamponu (50 mM) ve 0,1 mL o-dianisidin çözeltisi eklendikten sonra, kör tüpüne 0,1 mL distile su, standart tüpüne 0,1 mL SOD standardı ve deney tüpüne 0,1 mL postmitokondriyal fraksiyon ilave edildi. Her tüpe 30 saniye ara ile 0,2 mL riboflavin çözeltisi konulup 460 nm'deki absorbands değerleri okunduktan sonra tüpler 37°C'de, 20W floresans lamba bulunan etüvde 8 dakika inkübe edildi. Sürenin bitiminde tüplerin absorbandsı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbands arasındaki fark alındı.

### Hesaplama

Her bir örnek için SOD aktivitesi, standartlar kullanılarak ünite/mg protein olarak hesaplandı.

#### 3.5.14. Karaciğerde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini

Yöntemin esası, birinci basamakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in MPO etkisiyle parçalanmasından oluşan oksijen radikalinin (O<sup>-</sup>) ikinci basamakta hidrojen vericisi olan o-dianisidin dihidroklorüre (AH<sub>2</sub>) aktarılması sonucu oluşan renkli maddenin (A) ölçümüne dayanır (Hillegass ve ark. 1990; Singbartl ve ark. 2000).



**Kullanılan Çözeltiler:**

- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (% 0,05 g):** Yoğunluğu 1,11 g/mL olan % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 0,16 mL alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Fosfat tamponu (50 mM, pH 6):** a) 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve b) 0,87 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ayrı ayrı distile su ile çözülerek, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandıktan sonra a/b oranı 9/1 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 6'ya ayarlandı.
- **o-Dianizidin çözeltisi (0,52 mM):** 16 mg o-dianizidin.2HCl 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile çözüldükten sonra fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) çözeltisi (% 0,5 g):** 0,5 g HTAB fosfat tamponu ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

**Deneyin Yapılışı****Doku Homojenatının Hazırlanması**

- 1- 150 mg karaciğer dokusu tartılarak, 1,5 mL fosfat tamponunda homojenizatör ile 14.500 devir/dakika'da 20 saniye homojenize edildi.
- 2- Homojenat eppendorf tüplerine alınarak 10.000 rpm'de, +4°C'de, 15 dakika santrifüje edildi.
- 3- Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 1,5 mL HTAB ilave edildi.
- 4- 30 saniye vorteksle karıştırıldı.
- 5- 20 saniye sonikasyon yapıldıktan sonra -80°C'de donduruldu (yaklaşık 15 dakika) ve çözüldü.
- 6- 5. basamak 2 kez tekrarlandı.
- 7- Son çözülme işleminden sonra tüpler 10.000 rpm'de, +4°C'de, 15 dakika santrifüje edildi.
- 8- Süpernatant ile MPO aktivite tayini yapıldı.

Örnek ve kör küvetlerine 2 mL o-dianizidin çözeltisinden konulduktan sonra kör küvetine 0,5 mL HTAB çözeltisi ve örnek küvetine 0,5 mL süpernatant ilave edilerek örnek absorbansındaki artış köre karşı 25°C’de, 3 dakika boyunca 460 nm’de ölçüldü ve dakikadaki absorbans değişimi saptandı.

### Hesaplama

Her bir örnek için MPO aktivitesi, bu deneyde peroksit için belirlenmiş absorpsiyon katsayısı  $1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, ünite/g doku olarak hesaplandı. 1 ünite MPO, dakikada 1  $\mu\text{mol}$  peroksitin parçalanmasını kataliz eden enzim miktarıdır.

### 3.5.15. Karaciğerde Protein Miktarının Tayini

Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry ve ark. 1951). Yöntemin esası, alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulan proteinlerin Folin ayracı ile indirgenmesi sonucu oluşan mavi rengin şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

### Kullanılan Çözeltiler

- **Bakır sülfat çözeltisi (% 1 g):** 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  distile su ile çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- **Na-K tartarat çözeltisi (% 2 g):** 2 g Na-K tartarat distile su ile çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.
- **NaOH çözeltisi (0,1 N):** 4 g NaOH distile su ile çözülerek 1 L’ye tamamlandı.
- **Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g):** 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N NaOH ile çözülerek 1 L’ye tamamlandı.
- **Protein standart çözeltisi (% 100 mg):** 25 mg sığır serum albumini (BSA) distile su ile çözülerek 25 mL’ye tamamlandı.
- **Folin ayracı:** 10 g sodyum tungstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 2,5 g sodyum molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 70 mL distile su, 5 mL % 85’lik o-fosforik asit ve 10 mL

derişik HCl 250 mL'lik altı yuvarlak distilasyon balonuna konularak geri çeviren ısıtıcı altında 10 saat ısıtıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 15 g lityum sülfat, 5 mL distile su ve 1-2 damla brom ilave edilerek 15 dakika ocak altında geri çeviren soğutucu kullanılmadan ısıtıldı (bromun fazlasını bertaraf etmek için). Karışım soğutulduktan sonra 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti koyu sarı (altın sarısı) renkte olmalıdır.

### **Deneyin Yapılışı**

Reaksiyon karışımı: 1mL bakır sülfat çözeltisi, 1 mL Na-K tartarat çözeltisi ve 98 mL sodyum karbonat çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Örnek tüpüne 100 µL postmitokondriyal fraksiyon, standart tüpüne 25 µL BSA standardı ve 75 µL distile su, kör tüpüne 100 µL distile su konulduktan sonra her üç tüpe de 2 mL reaksiyon karışımı ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Sürenin bitiminde her üç tüpe de 100 µL folin ayıracı eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika karanlıkta bekletildi. Örnek ve standart absorbansları köre karşı 660 nm'de ölçüldü.

### **Hesaplama**

Her bir örnek için protein miktarı standartla kıyaslanarak, mg/mL olarak hesaplandı.

### **3.6. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler**

Tüm deneylerde elde edilen bulgular, unpaired *t*-testi ve ANOVA varyans analizi uygulanarak NCSS paket programına göre istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterildi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı  $p<0,05$  olarak kabul edildi (Hintze 1986).

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile oluşturulan karaciğer hasarına *Amaranthus lividus* (*A. blitum*) bitkisinin antioksidan ve hepatoprotektif etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 - 14 ve Şekil 4.1 - 14'lerde gösterilmiştir.

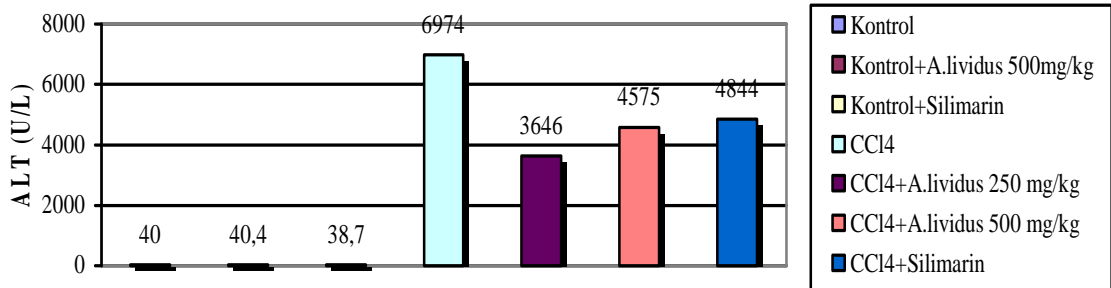
##### 4.1. Serumda Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu ALT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) grubunun ALT aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu, azalmanın 250 mg/kg ekstre verilen grupta daha çok olduğu bulundu. CCl<sub>4</sub>+ silimarin grubundaki azalmanın ise CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 4-1 ve Şekil 4-1).

**Tablo 4-1: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>ALT (U/L)</b>	40 ± 3,92	40,4 ± 11,65	38,7 ± 8,62	6974 ± 1716 <sup>a</sup>	3646 ± 741 <sup>b</sup>	4575 ± 650 <sup>b</sup>	4844 ± 2368
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-1: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesine etkisi.**

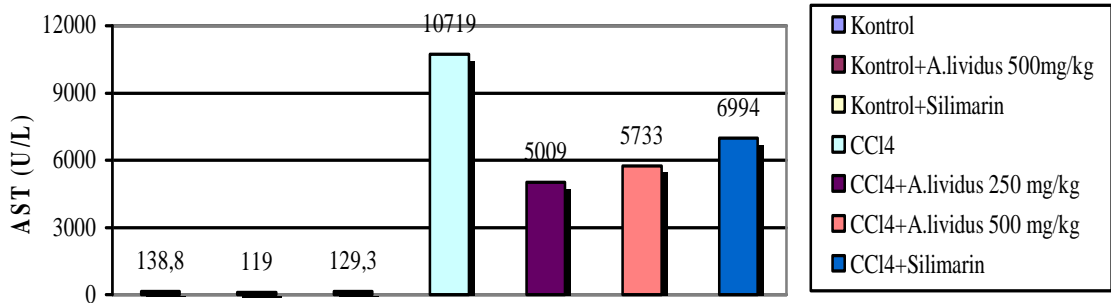
#### 4.2. Serumda Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu AST aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun AST aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu, azalmanın 250 mg/kg ekstre verilen grupta daha çok olduğu bulundu (Tablo 4-2 ve Şekil 4-2).

**Tablo 4-2: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>AST (U/L)</b>	138,8 ± 35	119±16,87	129,3 ± 26,9	10719 ± 2999 <sup>a</sup>	5009 ± 2339 <sup>b</sup>	5733 ± 1458 <sup>b</sup>	6994 ± 1684 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



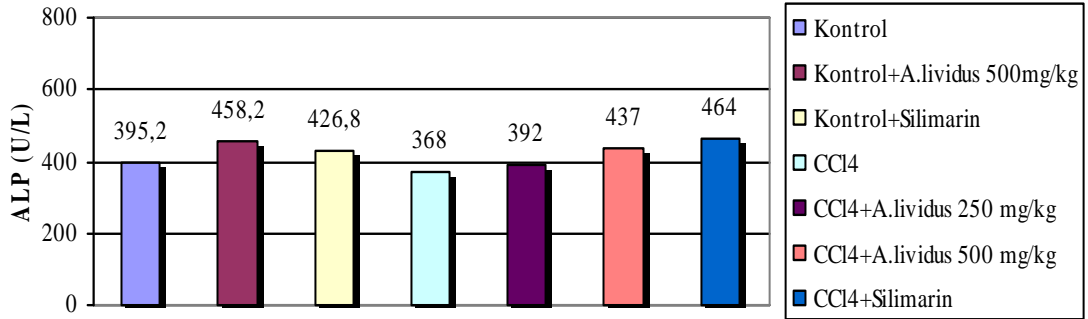
**Şekil 4-2: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesine etkisi.**

### 4.3. Serumda Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub>, *A.lividus* ve silimarin uygulanan tüm grupların ALP aktivitesinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-3 ve Şekil 4-3).

**Tablo 4-3: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alkalen fosfataz (ALP) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>ALP (U/L)</b>	395,2 ± 114	458,2 ± 81,6	426,8 ± 129	368 ± 128,6	392 ± 40,4	437 ± 72,6	464 ± 110,5
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0,545</b>							



**Şekil 4-3: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum alkalen fosfataz (ALP) aktivitesine etkisi.**

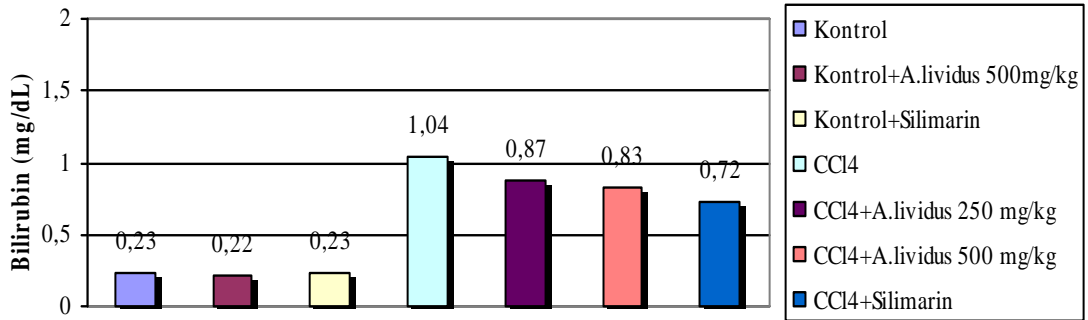
#### 4.4. Serumda Total Bilirubin Miktarının İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu total bilirubin düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunda ise total bilirubin düzeylerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre gözlenen azalmanın anlamlı derecede olmadığı bulundu (Tablo 4-4 ve Şekil 4-4).

**Tablo 4-4: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum bilirubin düzeyine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>Bilirubin (mg/dL)</b>	0,23 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,08	1,04 ± 0,46 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,36	0,83 ± 0,47	0,72 ± 0,39
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

c: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-4: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum bilirubin düzeyine etkisi.**

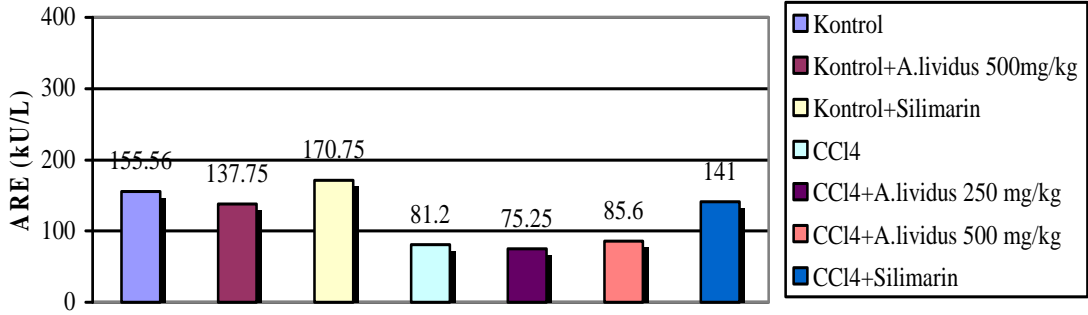
#### 4.5. Serumda Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu ARE aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun ARE aktivitesinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artma olduğu, CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (500 mg/kg) grubundaki artışın ise anlamlı olmadığı bulundu (Tablo 4-5 ve Şekil 4-5).

**Tablo 4-5: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum arilesteraz (ARE) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>ARE (kU/L)</b>	155 ± 56,4	137,75 ± 31	170,75 ± 44,3	81,2 ± 15,9 <sup>c</sup>	75,25 ± 14,3	85,6 ± 20,52	141 ± 37,14 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; c: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-5: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum arilesteraz (ARE) aktivitesine etkisi.**

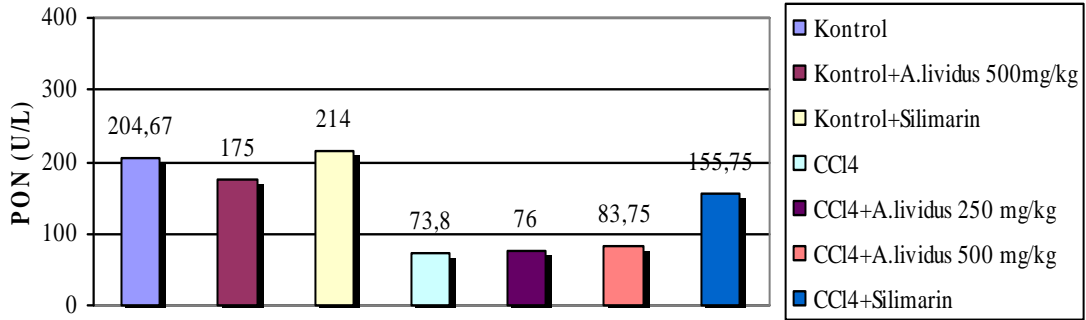
#### 4.6. Serumda Paraoksonaz (PON) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu PON aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun PON aktivitesinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artma olduğu, her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) grubundaki artışın ise anlamlı olmadığı bulundu (Tablo 4-6 ve Şekil 4-6).

**Tablo 4-6: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, serum paraoksonaz (PON) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>PON (U/L)</b>	204,6 ± 82	175 ± 62,7	214 ± 49,7	73,8 ± 23,2 <sup>c</sup>	76 ± 13,3	83,75 ± 20,5	155,75 ± 53,4 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; c: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-6: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda serum paraoksonaz (PON) aktivitesine etkisi.**

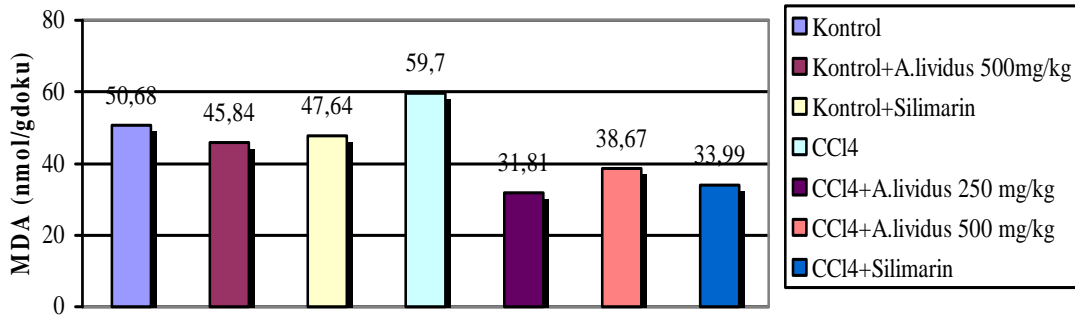
#### 4.7. Karaciğerde Lipit Peroksidasyonu (LPO)'nun İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı fakat bu artışın anlamlı olmadığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubu MDA düzeylerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu bulundu (Tablo 4-7 ve Şekil 4-7).

**Tablo 4-7: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer lipit peroksidasyonu düzeyine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>MDA (nmol/g doku)</b>	50,6 ± 9,9	45,8 ± 5,5	47,6 ± 9,2	59,7 ± 14,8	31,8 ± 5,2 <sup>d</sup>	38,6 ± 6,4 <sup>b</sup>	33,9 ± 6,1 <sup>d</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; d: p<0,001 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-7: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer lipit peroksidasyonu düzeyine etkisi.**

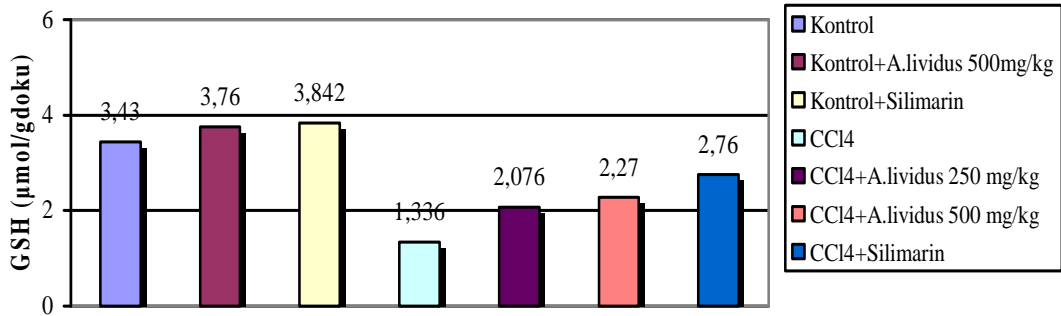
#### 4.8. Karaciğerde Glutasyon (GSH) Miktarının İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu GSH düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubu GSH düzeylerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu, artışın CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunda daha çok olduğu bulundu (Tablo 4-8 ve Şekil 4-8).

**Tablo 4-8: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutasyon (GSH) düzeyine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>GSH</b> (µmol/g doku)	3,43 ± 0,8	3,76 ± 0,6	3,84 ± 1,1	1,34 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,27 ± 0,6 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,5 <sup>d</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; d: p<0,001 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-8: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutasyon (GSH) düzeyine etkisi.**

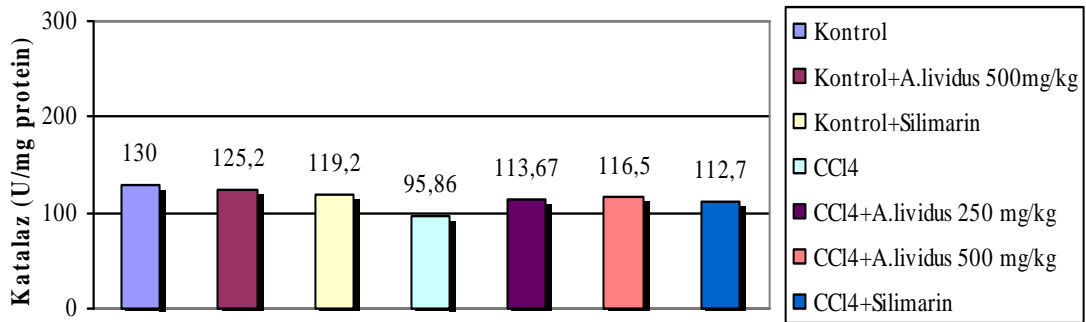
#### 4.9. Karaciğerde Katalaz (CAT) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun CAT aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu (Tablo 4-9 ve Şekil 4-9).

**Tablo 4-9: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer katalaz (CAT) düzeyine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>CAT (U/mg protein)</b>	130 ± 10,8	125,2 ± 7,43	119,2 ± 7,6	95,86 ± 7,36 <sup>a</sup>	113,67 ± 6,5 <sup>d</sup>	116,5 ± 7,5 <sup>b</sup>	112,7 ± 6,7 <sup>d</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; d: p<0,001 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-9: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer katalaz (CAT) aktivitesine etkisi.**

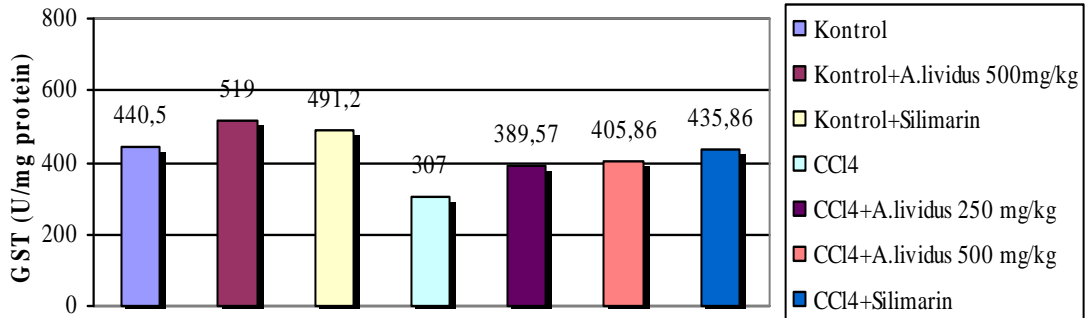
#### 4.10. Karaciğerde Glutatyon-S-transferaz (GST) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu GST aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun GST aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu (Tablo 4-10 ve Şekil 4-10).

**Tablo 4-10: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>GST (U/mg protein)</b>	440,5 ± 59	519 ± 14,6	491,2 ± 70,3	307 ± 40,4 <sup>c</sup>	389,57 ± 50 <sup>b</sup>	405,86 ± 50 <sup>b</sup>	435,86 ± 81,2 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; c: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-10: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkisi.**

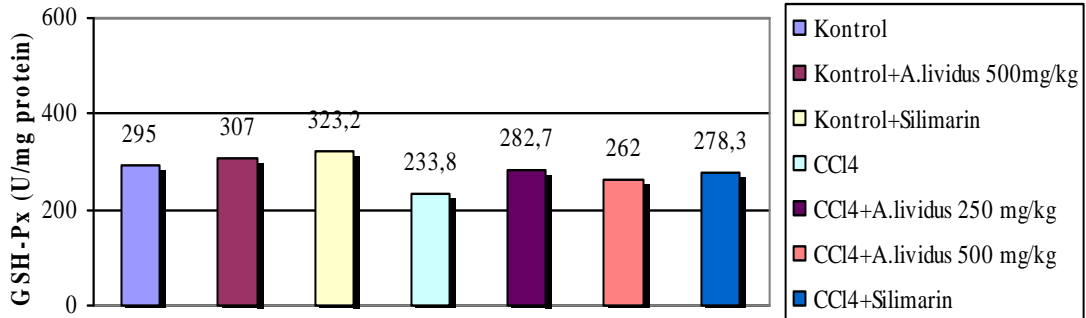
#### 4.11. Karaciğerde Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu GSH-Px aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun GSH-Px aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu (Tablo 4-11 ve Şekil 4-11).

**Tablo 4-11: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>GSH-Px (U/mg protein)</b>	295 ± 58,2	307 ± 45	323,2 ± 47,6	233,8 ± 21 <sup>c</sup>	282,7 ± 28,8 <sup>b</sup>	262 ± 13 <sup>b</sup>	278,3 ± 16,5 <sup>d</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; c: p<0,05 Kontrol grubuna göre anlamlı; d: p<0,001 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-11: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesine etkisi.**

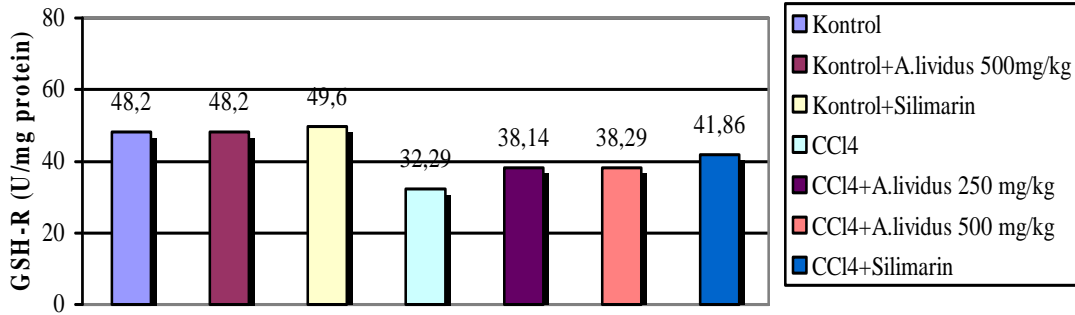
#### 4.12. Karaciğerde Glutatyon Redüktaz (GSH-R) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu GSH-R aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun GSH-R aktivitelelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu (Tablo 4-12 ve Şekil 4-12).

**Tablo 4-12: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer glutatyon redüktaz (GSH-R) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>GSH-R (U/mg protein)</b>	48,2 ± 3,9	48,2 ± 4,4	49,6 ± 3,9	32,29 ± 4,4 <sup>a</sup>	38,14 ± 3,6 <sup>b</sup>	38,29 ± 3,3 <sup>b</sup>	41,86 ± 4,5 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-12: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda karaciğer glutatyon redüktaz (GSH-R) aktivitesine etkisi.**

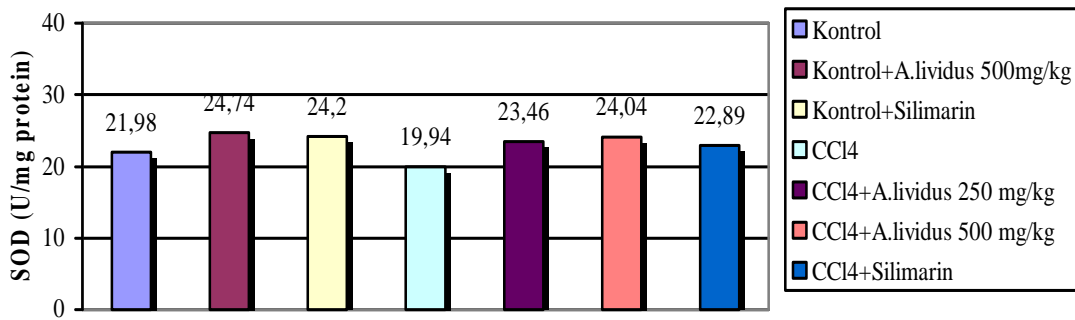
#### 4.13. Karaciğerde Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı, kontrol+A.*lividus* grubuna göre ise anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+A.*lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun SOD aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu (Tablo 4-13 ve Şekil 4-13)

**Tablo 4-13: A. lividus ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ A. <i>lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + A. <i>lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + A. <i>lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>SOD (U/mg protein)</b>	21,98 ± 2,2	24,74 ± 1,6	24,2 ± 2,5	19,94 ± 2,6 <sup>e</sup>	23,46 ± 2,5 <sup>b</sup>	24,04 ± 1,8 <sup>b</sup>	22,89 ± 1,5 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.007</b>							

b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; e: p<0,05 Kontrol + A.*lividus* grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-13: A. lividus ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine etkisi.**

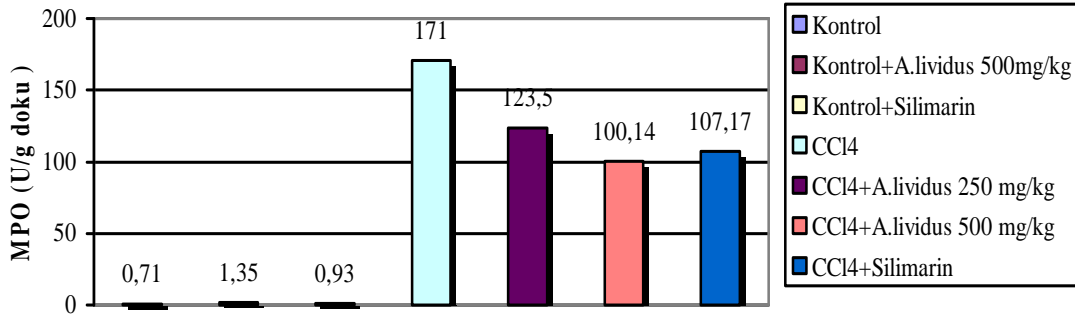
#### 4.14. Karaciğerde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin İncelenmesi

CCl<sub>4</sub> grubu MPO aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Her iki CCl<sub>4</sub>+*A.lividus* (250 ve 500 mg/kg) ve CCl<sub>4</sub>+silimarin grubunun MPO aktivitelerinde CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu bulundu (Tablo 4-14 ve Şekil 4-14).

**Tablo 4-14: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine etkisi (ortalama±standart sapma)**

	Kontrol	Kontrol+ <i>A.lividus</i> (500mg/kg)	Kontrol+ Silimarin	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (250 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + <i>A. lividus</i> (500 mg/kg)	CCl <sub>4</sub> + Silimarin
<b>MPO (U/g doku)</b>	0,71 ± 0,2	1,35 ± 0,67	0,93 ± 0,82	171 ± 36,4 <sup>a</sup>	123,5 ± 20,3 <sup>b</sup>	100,14 ± 19,3 <sup>d</sup>	107,17 ± 34,3 <sup>b</sup>
<b>P<sub>ANOVA</sub>: 0.0001</b>							

a: p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı; b: p<0,05 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı; d: p<0,001 CCl<sub>4</sub> grubuna göre anlamlı



**Şekil 4-14: *A. lividus* ekstresi ve silimarinin, CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine etkisi.**

## 5. TARTIŞMA

Karbon tetraklorür ( $\text{CCl}_4$ ) ilaçların ve bitki ekstraktlarının anti-hepatotoksik ve/veya hepatoprotektif aktivitelerini araştırmada yaygın olarak kullanılan standart bir hepatotoksindir. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından  $\text{CCl}_3^\bullet$  ve  $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$  gibi reaktif metabolitlerine dönüştürülür. Bu radikaller nükleik asit, protein ve lipitler gibi tüm hücrel moleküllerle etkileşebilir; özellikle membranların yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşimleri lipit peroksidasyonunu başlatarak karaciğer hasarı oluşmasına sebep olur (Slater 1984; Weber ve ark. 2003; Manibusan ve ark. 2007). Akut  $\text{CCl}_4$  uygulanmasının ardından prooksidanların ve antioksidan savunma sistemlerinin durumunu ve karaciğerde oluşturduğu hasarı gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Mehmetçik ve ark. 2008; Yang ve ark. 2008; Srivastava ve Shivanandappa 2010). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda  $\text{CCl}_4$ 'ün dozuna, uygulama şekline ve araştırılma zamanına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde  $\text{CCl}_4$ 'ün neden olduğu karaciğer hasarının 24 saat sonra belirginleştiğini bildiren bazı çalışmalar mevcuttur (Ilavarasan ve ark. 2003; Lee ve ark. 2007; Orhan ve ark. 2007). Çalışmamızda sıçanlara ön deneyler sonucunda belirlenen subletal doz  $\text{CCl}_4$  (1,5 mL/kg i.p.) uygulandı ve deneyler  $\text{CCl}_4$  uygulamasından 24 saat sonra elde edilen kan ve doku örnekleri ile yapıldı.

$\text{CCl}_4$  uygulaması, normalde sitoplazmada bulunan enzimlerin serumdaki miktarlarında artışa neden olur. ALT ve AST düzeylerindeki artış hücrel sızıntının ve karaciğer hücre membranı fonksiyonel bütünlüğünün kaybının göstergesidir. AST karaciğer, kalp kası, iskelet kası, pankreas, akciğer, beyinde bulunmasına rağmen, ALT karaciğerde en yüksek konsantrasyonda bulunur ve bu nedenle hepatoselüler hasar için AST'a göre daha hassas bir testtir. Enzimlerin yüksek miktarlarda dolaşıma geçmeleri çoğunlukla karaciğer nekrozu ile birlikte (Shyamal ve ark. 2006). Çalışmamızda tek doz  $\text{CCl}_4$  uygulanmasından 24 saat sonra sıçanlarda serum ALT ve AST aktivitelerinde çok yüksek oranda artış gözlenmiştir.  $\text{CCl}_4$  uygulamasından önce, 9 gün boyunca sıçanlara oral olarak 250 mg/kg ve 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi verilmesinin, koruyucu etki göstererek,  $\text{CCl}_4$  uygulaması sonucu artan AST ve ALT aktivitelerini anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Bu sonuç *A. lividus* ekstresinin  $\text{CCl}_4$ 'ün neden olduğu karaciğer hasarını tamir etmesinin yanı sıra, plazma membranı stabilizasyonunu

sağladığının göstergesidir. Ayrıca karaciğeri koruyucu etkisi bilindiği için standart olarak kullanılan silimarin de artmış AST ve ALT aktivitelerinde anlamlı derecede azalışa neden olmuştur.

Deneylerimizde  $CCl_4$  uygulaması grupların ALP aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. ALP daha çok intra ve ekstra hepatik safra kanalları hasarının göstergesi olduğundan, ALP aktivitelerinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemesi  $CCl_4$ 'ün etki mekanizmasının bu yönde olmadığını düşündürmektedir. Benzer şekilde Lee ve ark. (2007) akut  $CCl_4$  (% 50  $CCl_4$  2 mL/kg i.p.) uygulayarak karaciğer hasarı oluşturdukları çalışmalarında, serum ALP aktivitesinde bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir.

$CCl_4$  ile oluşturulan karaciğer hasarında safra salgılanmasındaki bozukluk artmış serum bilirubin düzeyleri ile kendini gösterir. Çalışmamızda  $CCl_4$  uygulamasının, benzer şekilde yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi (Senthilkumar ve ark. 2005; Kumar ve ark. 2009; Jain ve ark. 2008), sıçanların serum total bilirubin düzeylerinde anlamlı derecede artışa neden olduğu bulundu. 250 mg/kg ve 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi ve silimarin verilmesinin, serum total bilirubin düzeylerinde  $CCl_4$ 'ün neden olduğu artışı azalttığı, ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Serum total bilirubin düzeyindeki bu azalış, *A. lividus* ekstresinin karaciğerin normal fonksiyonel durumuna dönmesine olan etkisini göstermektedir.

MDA biyolojik membranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu boyunca açığa çıkan temel reaktif aldehittir. Bu nedenle hepatik MDA düzeyi karaciğer hasarının göstergesi olarak kullanılır.  $CCl_4$  metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerin ( $CCl_3^{\bullet}$  ve  $CCl_3OO^{\bullet}$ ) neden olduğu hepatosit membranlarındaki lipit peroksidasyonu,  $CCl_4$ 'ün oluşturduğu hepatotoksisitenin esas nedenidir (Recknagel ve ark.1989; Weber ve ark. 2003). Çalışmamızda akut  $CCl_4$  uygulanmasının MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artışa neden olduğu bulundu. 250 mg/kg ve 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi ve silimarin verilen gruplarda MDA düzeylerinde anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü. *A. lividus* ekstresi uygulanması ile MDA düzeylerindeki bu azalış, bitkinin  $CCl_4$  kaynaklı radikalleri süpürücü antioksidan etkisi ile ve bu etki sonucunda lipit peroksidasyonunu önlemesi ile açıklanabilir.

Hepatik GSH, oksidatif hasara karşı koruma ve non enzimatik ve enzimatik yollar ile, ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesini içeren çeşitli fizyolojik fonksiyonlara

sahip olan, hücrelerin en önemli antioksidanlarından biridir. GSH, CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu toksisitede CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> ile kovalent bağlanması ile önemli bir rol oynar. Ayrıca serbest radikal aracılı hepatik hücre hasarında, hepatoselüler GSH tükenmesinin, LPO oluşumuyla başlayan hücre hasarı ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Nishida ve ark. 1997). Çalışmamızda karaciğer GSH düzeylerinin CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin derecede azaldığı bulundu. Bununla birlikte 250 mg/kg ve 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi ve silimarin verilmesinin gruplarda CCl<sub>4</sub>'ün neden olduğu hepatik GSH azalmasını benzer şekilde önlediği gözlemlendi. *A. lividus* ekstresinin GSH düzeyini arttırması,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz gibi GSH sentezleyen enzimlerin aktivitelerinin arttırması veya GSH-R aktivasyonunu sağlayarak GSSG'un GSH'a dönüşümünü arttırması ile ilişkili olabilir.

CAT, SOD, GSH-Px, GSH-R ve GST hücrelerde reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimlerdir. SOD, antioksidan savunmada ilk sırayı alır, süperoksit radikalının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e dismutasyonunu gerçekleştirir ve CAT/GSH-Px ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya dönüştürür. GSH-R, GSH-Px reaksiyonu sonucu oluşan GSSG'un rejenerasyonundan sorumludur. Faz II enzimi olan GST, ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyerek zehirsizleştirilmelerinde önemli rol oynar (Singh ve ark. 2008). Lipit peroksitleri veya reaktif oksijen türleri antioksidan enzimlerde inaktivasyona neden olur (Brown ve Borutaite 2006; Yang ve ark. 2008). Karaciğerde CCl<sub>4</sub> ile oluşan oksidatif stres sonucunda da antioksidan enzim aktiviterinde azalma görülür (Ilavarasan ve ark. 2003; Raja ve ark. 2007; Ranawat ve ark. 2010). Çalışmamızda tek doz CCl<sub>4</sub> uygulanmasının CAT, SOD, GSH-Px, GSH-R ve GST aktivitelerini azalttığı bulundu. 250 mg/kg ve 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi ve silimarin verilmesinin antioksidan enzimlerdeki bu azalmayı anlamlı derecede arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca *A. lividus* ekstresi verilen kontrol grubunda GST aktivitesinde anlamlı derecede artış gözlemlendi. Bu artışlar *A. lividus* ekstresinin sahip olduğu antioksidan aktiviteyi göstermektedir.

Literatürde CCl<sub>4</sub> ile karaciğer hasarı oluşturulmuş hayvanlarda *Amaranthus* türlerinin hepatoprotektif etkisini inceleyen tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Zeashan ve ark. (2008) *Amaranthus spinosus*'un tümü ile hazırlanan etanol ekstresinin 100, 200 ve 400 mg/kg uygulanmasının CCl<sub>4</sub> (% 50 oranında zeytin yağı ile seyreltilmiş 1 mL/kg i.p.) toksisitesine karşı hepatoprotektif etkisi olduğunu göstermişlerdir.

*A. spinosus* ön uygulamasının artan serum ALT, AST ve ALP aktivitelerini ve bilirubin düzeyini azalttığı, ayrıca MDA, GSH, SOD ve CAT gibi antioksidan parametreler üzerine pozitif etki gösterdiği bulunmuş ve bitkinin sahip olduğu hepatoprotektif etkisinin yapısında bulunan flavanoitlerden ve fenolik bileşiklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür.

Aril esteraz (ARE) aktivitesine de sahip olan paraoksonaz (PON), lipit peroksitleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi oksidan yapıları enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> özellikle ateroskleroz sırasında arter duvarı endotelinde oluşan major bir reaktif oksijen türüdür ve LDL oksidasyonuna yol açarak, daha potent oksidatif ürünler oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu nedenle paraoksonaz enziminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i hidroliz edebilme yeteneği özellikle potent oksidan yapıların ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Üstündağ ve ark. 2005). Çalışmamızda tek doz CCl<sub>4</sub> (1,5 mL/kg i.p) uygulanmasının serum PON ve ARE aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olduğu görüldü. PON ve ARE aktivitesindeki bu azalışın ancak silimarin uygulanması ile anlamlı dercede arttığı bulundu. 500 mg/kg *A. lividus* ekstresi uygulanan gruptaki artışın anlamlı olmadığı gözlemlendi.

Nötrofiller reaktif oksijen türlerinin önemli bir kaynağıdır. İçerdikleri NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile moleküler oksijeni süperoksit radikaline dönüştürürler. Süperoksit radikalinden oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, miyeloperoksidaz (MPO) aracılığıyla Cl<sup>-</sup> iyonundan hipoklorik asit oluşumuna neden olur. Oluşan hipoklorik asit sülfidlerin oksidasyonuna, sitokrom ve hem proteinlerinin inaktivasyonuna, amino asit ve proteinlerin parçalanmasına yol açarak sitotoksik etki göstermektedir (Maruyama ve ark. 2004) Çalışmamızda CCl<sub>4</sub> verilmesi ile karaciğer dokusunda artmış olan ve inflamasyon ve nekrozun göstergesi olan MPO aktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır. *A. lividus* ve silimarin verilmesi ile serbest radikal oluşumu azaltılmış ve miyeloperoksidaz aktivitesinde CCl<sub>4</sub> verilen gruplara göre anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak *Amaranthus lividus* L. bitkisinin sıçanlarda CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bulunmuş ve bu etkinin *A.lividus*'un antioksidan özelliklerinden ileri geldiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

Aebi, H. (1974). Catalase, İçinde H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, New York and London: Academic Press; 673-7.

Altınışık, M. (2001). *Serbest radikaller*. 2000-2001 yılı sunuları. Erişim 13.05.2010, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf>.

Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K. ve Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **60**, 240-57.

Amin, I., Norazaidah, Y., Hainida ve K.I. Emmy. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chemistry*, **94**, 47-52.

Anilakumar, K.R., Khanum, F. ve Santhanam, K. (2006). Amelioration of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress by amaranth leaves in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, **61**, 169-73.

Anilakumar, K.R., Khanum, F., Sudarshanakrishna, K.R. ve Santhanam, K. (2004). Effect of amaranth leaves on dimethylhydrazine-induced changes in multicomponent antioxidant system of rat liver. *Indian Journal of Experimental Biology*, **42**, 595-600.

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **7**, 199-212.

Balistreri, W.F. ve Rej, R. (1994). Liver function. İçinde C.A. Burtis, E.R. Ashwood (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (2nd ed.), Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1449-1512.

Barbarino, F., Neumann, E., Deaciuc, I., Ghelberg, N.W., Suciu, A., Cotuřiu, C. ve ark. (1981). Effect of silymarin on experimental liver lesions. *Médecine Interne*, **19**, 347-57.

Barnes, J., Anderson, L.A. ve Phillipson, J.D. (2007). *Herbal Medicine*. (3rd ed.). London: Pharmaceutical Press.

Baytop, T. (1994). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Ankara: Türk Tarih Kurumu Basım Evi.

Bergmeyer, H.U. (1980). IFCC methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3, IFCC. Method for alanine aminotransferase (L-alanine 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *Clinica Chimica Acta*, **105**, 147-72.

Bergmeyer, H.U., Horder, M. ve Rej, R. (1986). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **24**, 497-510.

Beutler, E., Duron, O. ve Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **61**, 882-8.

Bindoli, A., Cavallini, L. ve Siliprandi, N. (1977). Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochemical Pharmacology*, **26**, 2405-9.

Brown, G.C. ve Borutaite, V. (2006). Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Biochemical Society Transactions*, **34**, 953-6.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plant*. (2nd ed.). Paris: Lavoisier Publishing.

Buege, J.A. ve Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, **52**, 302-10.

Burroughs, A.K. ve Westaby, D. (2005). Liver, biliary tract and pancreatic disease. İçinde P. Kumar, M. Clark (Eds.), *Clinical Medicine* (6th ed.): Elsevier Saunders; 347-417.

Carlberg, I. ve Mannervik, B. (1977). Purification by affinity chromatography of yeast glutathione reductase, the enzyme responsible for the nadph-dependent reduction

of the mixed disulfide of coenzyme A and glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta*, **484**, 268-74.

Chaturvedi, A., Sarojini, G. ve Devi, N.L. (1993). Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, **44**, 63-70.

Chaudière, J. ve Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 949-62.

Chrungoo, V.J., Singh, K. ve Singh, J. (1997). Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*, **35**, 611-7.

Conforti, F., Statti, G., Loizzo, M.R., Sacchetti, G., Poli, F. ve Menichini, F. (2005). In vitro antioxidant effect and inhibition of alpha-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 1098-102.

Cordero-de-los-Santos, M.Y., Osuna-Castro, J.A., Borodanenko, A. ve Parades-Lopez, O. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*, **11**, 269–80.

Czerwiński, J., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Lange, E., Leontowicz, M., Katrich, E. ve ark. (2004). Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 622-9.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. ve Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, **52**, 601-23.

Davis, P.H. (Ed.). (1967). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol 2. Edinburg: Edinburg University Press.

Davis, P.H. (Ed.). (1975). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol 5. Edinburg: Edinburg University Press.

De La Puerta, R., Martinez, E., Bravo, L. ve Ahumada, M.C. (1996). Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **48**, 968-70.

De Macvean, A.L. ve Pöll, E. (1997). Chapter 8: Ethnobotany. İçinde J.A. Vozzo (Ed.), *Tropical Tree Seed Manual*. Guatemala: USDA Forest Service; 215-9.

Dehmlow, C., Erhard, J. ve de Groot, H. (1996a). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, **23**, 749-54.

Dehmlow, C., Murawski, N. ve de Groot, H. (1996b). Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sciences*, **58**, 1591-600.

Desplaces, A., Choppin, J., Vogel, G. ve Trost, W. (1975). The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung*, **25**, 89-96.

Dhanabal, S.P., Syamala, G., Satish Kumar, M.N. ve Suresh, B. (2006). Hepatoprotective activity of the Indian medicinal plant *Polygala arvensis* on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*, **77**, 472-4.

Dhiman, R.K. ve Chawla, Y.K. (2005). Herbal medicines for liver diseases. *Digestive Diseases and Sciences*, **50**, 1807-12.

Durrington, P.N., Mackness, B. ve Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 473-80.

Escudero, N.L., De Arellano, M.L., Luco, J.M., Giménez, M.S. ve Mucciarelli, S.I. (2004). Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. *Plant Foods for Human Nutrition*, **59**, 15-21.

Fantozzi, R., Brunelleschi, S., Rubino, A., Tarli, S., Masini, E. ve Mannaioni, P.F. (1986). FMLP-activated neutrophils evoke histamine release from mast cells. *Agents and Actions*, **18**, 155-8.

Favari, L. ve Pérez-Alvarez, V. (1997). Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl<sub>4</sub>-chronic liver damage in rats. *Archives of Medical Research*, **28**, 11-7.

Fuchs, E.C., Weyhenmeyer, R. ve Weiner, O.H. (1997). Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung*, **47**, 1383-7.

Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W. ve La Du, B.N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition*, **19**, 100-6.

Gazák, R., Walterová, D. ve Kren, V. (2007). Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, **14**, 315-38.

Grubben, G.J.H. (2004). *Amaranthus blitum* L. İçinde G.J.H. Grubben, O.A. Denton (Eds.), *Vegetables: Plant Resources of Tropical Africa 2* (Prota2). 63-65. Erişim 21.11.2008, <http://database.prota.org/search.htm>

Gülcü, F. ve Gürsu, M.F. (2003). Paraoksonaz ve aril esteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi*, **28**, 45-49.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C. (Eds.). (2000). *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol 11. Edinburg: Edinburg University Press.

Habig, W.H. ve Jacoby, W.B. (1981). Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*, **77**, 398-405.

Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: A review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **82**, 747-52.

Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *The Biochemical Journal*, **401**, 1-11.

Halliwell, B. ve Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 715-25.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical Journal*, **219**, 1-14.

Hillegass, L.M., Griswold, D.E., Brickson, B. ve Albrightson-Winslow, C. (1990). Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *Journal of Pharmacological Methods*, **24**, 285-95.

Hintze, J.L. (1986). Number Cruncher Statistical System Copyright C, 865, East 400, North Kaysville, Utah, 84037 (801) 546-0445.

Ilavarasan, R., Vasudevan, M., Anbazhagan, S. ve Venkataraman, S. (2003). Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 227-30.

Ilavarasan, R., Vasudevan, M., Anbazhagan, S. ve Venkataraman, S. (2003). Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 227-30.

Jain, A., Soni, M., Deb, L., Jain, A., Rout, S.P., Gupta, V.B. ve ark. (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *momordica dioica* roxb. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **115**, 61-6.

Janick, J. ve Whipkey, A (Eds.). (2007). *Issues in new crops and new uses*. VA: American Society for Horticultural Science Press.

Jendrassik, L. ve Gróf, P. (1938). Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Bilirubins. *Biochemische Zeitschrift*, **297**, 81-9.

Juretić, D., Tadijanović, M., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. ve Baricić, M. (2001). Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: Cohort study. *Croatian Medical Journal*, **42**, 146-50.

Kehrer, J.P. ve Smith, C.V. (1994). Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. İçinde: B. Frei (Ed.), *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. San Diego: Academic Press; 25-62.

Kim, H.K., Kim, M.J. ve Shin, D.H. (2006a). Improvement of lipid profile by amaranth (*Amaranthus esculantus*) supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **50**, 277-81.

Kim, H.K., Kim, M.J., Cho, H.Y., Kim, E.K. ve Shin, D.H. (2006b). Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function*, **24**, 195-9.

Klimczak, I., Małecka, M. ve Pacholek, B. (2002). Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Die Nahrung*, **46**, 184-6.

Kren, V. ve Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, **149**, 29-41.

Kropáčová, K., Misúrová, E. ve Haková, H. (1998). Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage. *Radiatsionnaia Biologiya, Radioecologia*, **38**, 411-5.

Kumar, S., Ravi Kumar, B. Ve Krishna Mohan, G. (2009). Hepatoprotective effect of *trichosanthes cucumerina* var *cucumerina* l. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **123**, 347-50.

Lawrence, R.A. ve Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **71**, 952-8.

Lee, C.P., Shih, P.H., Hsu, C.L. ve Yen, G.C. (2007). Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 888-95.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-75.

Luper, S. (1998). A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Alternative Medicine Review*, **3**, 410-21.

Manibusan, M.K., Odin, M. Ve Eastmond, D.A. (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, **25**, 185-209.

Maruyama, Y., Lindholm, B. ve Stenvinkel, P. (2004). Inflammation and oxidative stress in ESRD--the role of myeloperoxidase. *Journal of Nephrology*, **8**, 72-6.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. ve Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, **32**, 595-603.

Mehmetçik, G., Ozdemirler, G., Koçak-Toker, N., Cevikbaş, U. ve Uysal, M. (2008). Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **60**, 475-80.

Mira, L., Silva, M. ve Manso, C.F. (1994). Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochemical Pharmacology*, **48**, 753-9.

Monograph. (1999). *Silybum marianum* (Milk thistle). *Alternative Medicine Review*, **4**, 272-4.

Morazzoni, P. ve Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum* (carduus marianus). *Fitoterapia*, **LXVI**, 3-42.

Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S. ve Pifferi, G. (1993). Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **18**, 289-97.

Muriel, P. ve Mourelle, M. (1990). Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl<sub>4</sub> liver damage. *Journal of Applied Toxicology*, **10**, 275-9.

Muriel, P., Garciapiña, T., Perez-Alvarez, V. ve Mourelle, M. (1992). Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology*, **12**, 439-42.

Mügge, A. (1998). The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Zeitschrift für Kardiologie*, **87**, 851-64.

Myroie, A.A., Collins, H., Umbles, C. ve Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **82**, 512-20.

Naaz, F., Javed, S. ve Abdin, M.Z. (2007). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. on aflatoxin B1-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 503-9.

Nishida, K., Ohta, Y. ve Ishiguro, I. (1997). Modulating role of endogenous reduced glutathione in tert-butyl hydroperoxide-induced cell injury in isolated rat hepatocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, **23**, 453-62.

Nsimba, R.Y., Kikuzaki, H. ve Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chemistry*, **106**, 760-6.

Ogino, K. ve Wang, D.H. (2007). Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Medica Okayama*, **61**, 181-9.

Olajide, O.A., Ogunleye B.R. ve Erinle, T.O. (2004). Anti-inflammatory properties of *Amaranthus spinosus* leaf extract. *Pharmaceutical Biology*, **42**, 521-5.

Orhan, D.D., Orhan, N., Ergun, E. ve Ergun, F. (2007). Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**, 145-51.

Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A. ve Yanardag, R. (2009). *In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*, **116**, 867-72.

Özhatay, N. ve Kültür, Ş. (2006). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey III. *Turkish Journal of Botany*, **30**, 281-316.

Palmieri, B. ve Sblendorio, V. (2006). Oxidative stress detection: What for? Part I. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **10**, 291-317.

Pascual, C., Gonz, R., Armesto, J. ve Muriel, P. (1993). Effect of silymarin and silybinin on oxygen radicals. *Drug Development Research*, **29**, 73-7.

Paško, P., Bartoń, H., Fołta, M. ve Gwizdz, J. (2007). Evaluation of antioxidant activity of amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain and by-products (flour, popping, cereal). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, **58**, 35-40.

Plate, A.Y.A. ve Arêas J.A.G. (2002). Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chemistry*, **76**, 1-6.

Pradhan, S.C. ve Girish, C. (2006). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *The Indian Journal of Medical Research*, **124**, 491-504.

Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L. ve ark. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man!. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **291**, 491-511.

Raja, S., Ahamed, K.F., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P.K. (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 41-7.

Ranawat, L., Bhatt, J. ve Patel, J. (2010). Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **127**, 777-80.

Recknagel, R.O., Glende, E.A. Jr, Dolak, J.A. ve Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, **43**, 139-54.

Roman, R.M., Wendland, A.E. ve Polanczyk, C.A. (2008). Myeloperoxidase and coronary arterial disease: From research to clinical practice. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **91**, 11-9.

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

Sangameswaran, B. ve Jayakar, B. (2008). Anti-diabetic, anti-hyperlipidemic and spermatogenic effects of *Amaranthus spinosus* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Natural Medicines*, **62**, 79-82.

Sani, H.A., Rahmat, A., Ismail, M., Rosli, R. ve Endrini, S. (2004). Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **13**, 396-400.

Schandalik, R., Gatti, G. ve Perucca, E. (1992). Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung*, **42**, 964-8.

Senthilkumar, K.T., Raj Kapoor, B. ve Kavimani, S. (2005). Protective effect of *Enicostemma littorale* against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats. *Pharmaceutical Biology*, **43**, 485-7.

Shukla, S., Bhargava, A., Chatterjee, A., Srivastava, J., Singh, N. ve Singh, S.P. (2006). Mineral profile and variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*). *Plant Foods for Human Nutrition*, **61**, 23-8.

Shyamal, S., Latha, P.G., Shine, V.J., Suja, S.R., Rajasekharan, S. ve Ganga Devi, T. (2006). Hepatoprotective effects of *Pittosporum neelgherrense* Wight&Arn., a popular Indian ethnomedicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 151-5.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, **215**, 213-9.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82**, 291-5.

Singbartl, K., Green, S.A. ve Ley, K. (2000). Blocking p-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *The Faseb Journal*, **14**, 48-54.

Singh, N., Kamath, V., Narasimhamurthy, K. ve Rajini, P.S. (2008). Protective effect of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**, 241-6.

Slater, T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical Journal*, **222**, 1-15.

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. ve Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, **28**, 41-55.

Southorn, P.A. ve Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, **63**, 381-9.

Srivastava, A. ve Shivanandappa, T. (2010). Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chemistry*, **118**, 411-417.

Teutonico, R.A. ve Knorr, D. (1985). Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology*, **39**, 49-61.

Thomas, R. (2005). *Amaranth the solution to world hunger, malnutrition, disease, and poverty*. Erişim 02.06.2010 infiniteplaythefilm.com/amaranth.aspx.

Tuncer, M. ve Erzin, Y. (2002). Sistemik hastalıklarda karaciğer. İçinde A. Özden, B. Şahin, U. Yılmaz, İ. Soykan (Eds.), *Gastroenteroloji*. Türk Gastroenteroloji Vakfı (TGV): Fersa Matbaacılık Ltd. Şti. 627-636.

Uysal, M. (2010). Serbest radikaller ve oksidatif stres. İçinde F. Gürdöl, E. Ademoğlu (Eds.), *Biyokimya* (2nd ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 647-52.

Üstündağ, B., Bahçecioğlu, H.İ., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S. ve Özercan, H. (2005). Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl<sub>4</sub>) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **19**, 263-71.

Valenzuela, A. ve Garrido, A. (1994). Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological Research*, **27**, 105-12.

Valenzuela, A., Aspillaga, M., Vial, S. ve Guerra, R. (1989). Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Medica*, **55**, 420-2.

Valenzuela, A., Guerra, R. ve Videla, L.A. (1986). Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Planta Medica*, **52**, 438-40.

Valenzuela, A., Lagos, C., Schmidt, K. ve Videla, L.A. (1985). Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochemical Pharmacology*, **34**, 2209-12.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**, 1-40.

Varghese, L., Agarwal, C., Tyagi, A., Singh, R.P. ve Agarwal, R. (2005). Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **11**, 8441-8.

Walter, K. ve Schült, C. (1974). Acid and alkaline phosphatase in serum. İçinde H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, New York:Academic Press, **2**, 860-4,

Wang, X. ve Quinn, P.J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, **38**, 309-36.

Weber, L.W., Boll, M. ve Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, **33**, 105-36.

Wellington, K. ve Jarvis, B. (2001). Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*, **15**, 465-89.

Weyhenmeyer, R., Mascher, H. ve Birkmayer, J. (1992). Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, **30**, 134-8.

Wu, C.G., Chamuleau, R.A., Bosch, K.S. ve Frederiks, W.M. (1993). Protective effect of silymarin on rat liver injury induced by ischemia. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, **64**, 259-63.

Wu, D. ve Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, **27**, 277-84.

[www.guenther-blaich.de/pflseite.php?par=Amaranthus+blitum](http://www.guenther-blaich.de/pflseite.php?par=Amaranthus+blitum)

[www.medscape.com/.../98/449855/449855\\_fig.html](http://www.medscape.com/.../98/449855/449855_fig.html)

[www.svhrad.com/DigLib/Gastrointestinal/Liver/Segmental%20Anatomy/Liver%20Segments.htm](http://www.svhrad.com/DigLib/Gastrointestinal/Liver/Segmental%20Anatomy/Liver%20Segments.htm)

Yang, Y.S., Ahn, T.H., Lee, J.C., Moon, C.J., Kim, S.H., Jun, W. ve ark. (2008). Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 380-7.

Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S. ve Rao, C.V. (2008). Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3417-21.

Zhao, J. ve Agarwal, R. (1999). Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: Implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis*, **20**, 2101-8.

Zi, X., Feyes, D.K. ve Agarwal, R. (1998a). Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clinical Cancer Research*, **4**, 1055-64.

Zi, X., Grasso, A.W., Kung, H.J. ve Agarwal, R. (1998b). A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Research*, **58**, 1920-9.

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI



Sayı : 18527

Konu :

16 Temmuz 2007  
İstanbul, ..... / ..... / .....

İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü  
Personel Daire Başkanlığına

İlgi: 18.06.2007 tarihli, 27738 sayılı yazınıza:

Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. AYŞE CAN'ın danışmanlığı altında doktora eğitimini sürdüren Araşt. Gör. TUĞBA YILMAZ'ın yürüteceği " Sıçanlarda Karbon Tetraklorürü ile Oluşturulan Karaciğer Hasarına *Amaranthus Lividus* ( A. Blitum) bitkisinin Antioksidan ve Hepatoprotektif Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri 19 Haziran 2007 tarihinde toplanan Fakültemiz Deney Hayvanları Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, oy birliği ile çalışmanın başlamasına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, saygılarımla arz ederim.

EKİ:  
1 dosya

*Tuncay Altuğ*  
Prof.Dr.Tuncay ALTUĞ  
Deney Hayvanları Etik  
Kurul Başkanı

Prof.Dr. SERGÜLEN DERSİOĞLU  
Patoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr.HAKKI OKTAY SEYMEN (KONGREDE)  
Fizyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. AHMET DİRİCAN (İZİNLE)  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. PERVİN BOZKURT  
Anesteziyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. ÖNER SÜZER  
Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. METİN CANER  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Doç.Dr. FADIL AYAN  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Doç.Dr. HATUN HANZADE AKDENİZ DOĞAN  
Deontoloji ve Tıp Tarihi

Yard.Doç.Dr. SERDAL UĞURLU  
Veteriner Hekim

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Tuğba	<b>Soyadı</b>	YILMAZ
<b>Doğ.Yeri</b>	Sivas	<b>Doğ.Tar.</b>	30/08/1980
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	26527914118
<b>Email</b>	tugbay@istanbul.edu.tr	<b>Tel</b>	(0212)4400000/13411

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	2010
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	2005
<b>Lisans</b>	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2002
<b>Lise</b>	Sivas Lisesi	1998

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	8 yıl (2002- )

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	62,5	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	77	80	82

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

### Yayınları:

Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A. ve Yanardag, R. (2009). *In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*, **116**, 867-72.

**Tebliğleri:**

Can, A., Ozsoy, N., Yılmaz, T., Kurt, O., Yanardag, R. (2009). In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. 19th International Congress of Nutrition (ICN 2009), Annals of Nutrition & Metabolism 55 (suppl. 1), Abstracts, s.178, P5-21, 4-9 October 2009, Bangkok, Thailand.

Özsoy, N., Can, A., Kurt, Ö., Yılmaz, T., Yanardağ, R. (2006). *Amaranthus lividus* (A. blitum) ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. XX. Ulusal Kimya Kongresi, Posterler (CD), BKP-34, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.

Yılmaz, T., Can A. (2005). *Aloe vera* L. Yapraklarından  $\beta$ -D-Glukozidaz'ın Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. 19. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Dergisi, Özel Sayı, vol. 30, p.164-165, P-140, Antalya, 22-25 Nisan 2005.

**Sertifikaları:**

'Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu', İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 14-15 Aralık 2005.

**Özel İlgilendiği Alanları (Hobileri):** Spor yapmak, sinemaya gitmek, kitap okumak.