

**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNİN SU EKSTRESİNİN
RATLARDA KARRAGENİNLE OLUŞTURULAN
İNFLAMASYON MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE ANTİOKSİDAN
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Emrullah DORMAN

Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Mesut B. HALICI

Doç. Dr. Zekai HALICI (Ortak Danışman)

Yüksek Lisans Tezi - 2012

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

**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNİN SU EKSTRESİNİN
RATLARDA KARRAGENİNLE OLUŞTURULAN
İNFLAMASYON MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE ANTİOKSİDAN
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Emrullah DORMAN

**Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Mesut B. HALICI
Doç. Dr. Zekai HALICI (Ortak Danışman)**

**ERZURUM
2012**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MACLURA POMİFERA BİTKİSİNİN SU EKSTRESİNİN
RATLARDA KARRAGENİNLE OLUŞTURULAN İNFLAMASYON
MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE
ANTİOKSİDAN MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Emrullah DORMAN

Tez Savunma Tarihi :10.08.2012

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mesut B. HALICI

Ortak Danışman : Doç. Dr. Zekai HALICI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Özgür KAYNAR

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-20012

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Moraceae (Dutgiller).....	6
2.1.1. Maclura pomifera (Yalancı Portakal)	6
2.2. İnflamasyon	8
2.2.1. Akut inflamasyon.....	10
2.2.2. Kronik İnflamasyon	12
2.3. Anti-inflamatuvar İlaçlar:	13
2.3.1. Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (SAEI).....	13
2.3.2. Non Steroidal Anti-inflamatuvar İlaçlar	13
2.4. Antioksidanlar.....	15
2.4.1. Serbest Radikaller	17
2.4.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	23
2.4.3. Serbest Radikallerin Etkileri	28
3. MATERYAL VE METOT.....	41
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar.....	41
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	41
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	41
3.4. Deney Bitkileri.....	44

3.5. Bitki Ekstresinin Hazırlanması	44
3.6. Deney Hayvanları	44
3.7. Karragenin Kullanılarak Akut İnflamasyon Oluşturulması.....	45
3.8. Biyokimyasal Ölçümler	46
3.8.1. Biyokimyasal Analizler İçin Pençe Doku Homojenatlarının Hazırlanması	46
3.8.2. CAT Aktivitesinin Ölçümü.....	46
3.8.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü.....	47
3.8.4. Total GSH Miktarı Ölçümü	49
3.8.5. LPO miktarı ölçümü	50
3.9. İstatistiksel Analizler	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Makroskopik Bulgular	53
4.1.1. Karragenin (CAR) ile Deneysel Olarak Oluşturulan Pençe Ödemleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE) ve Referans İlaç Olarak Kullanılan İndometazin (IND)'in Etkileri	53
4.2. Biyokimyasal Bulgular	55
4.2.1. Rat Pençelerindeki Katalaz (CAT) Enzim Aktiviteleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE)'nin, İndometazin (IND)' in Etkileri	56
4.2.2. Rat pençelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine Maclura pomifera'dan elde edilen su ekstresinin (MPSE)'nin, indometazin (IND) etkileri	57
4.2.3. Rat Pençelerindeki Glutatyon (GSH) Seviyeleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE), İndometazin (IND) 'nın Etkileri	59
4.2.4. Rat Pençelerindeki Lipit Peroksidasyon (LPO) Seviyeleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE)'nin, İndometazin (IND) Etkileri	60

5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	90
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	90
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	91

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut B. HALICI'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmamda bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Doç. Dr. Zekai HALICI'ya,

Yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür KAYNAR'a, deneysel çalışmalarda emeği bulunan Araş. Gör. H. Serkan EROL'a ve Recai ACI'ya ayrıca tüm Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD çalışanlarına, bu çalışmayı **2010/122 BAP** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Bitkilerin temini ve teşhisinde her türlü desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU ve Dr. Murat KOÇ'a,

Yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyelerine ve tüm biyokimya çalışanlarına,

Çalışmalarım esnasında hayvanların temini ve deney aşamasında yardımlarından dolayı hocam Sayın Yrd. Doç. Dr Sinan AKTAŞ'a, her türlü desteği ile hocam sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail CAN'a,

Yıllardır aynı ortamda beraber çalıştığım ve bu tez aşamasında maddi, manevi ve ilmi desteğini eksik etmeyen Uzm. Biyolog Aybike HIZARCI'ya, ayrıca Tuba SUCİ'ye,

çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Emrullah DORMAN

ÖZET

Maclura Pomifera Bitkisinin Su Ekstresinin Ratlarda Karrageninle Oluşturulan İnflamasyon Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması ve Antioksidan Mekanizmasının İncelenmesi

Amaç. Bu araştırmada; ratlarda karragenin ile oluşturulan akut inflamasyon modeli kullanılarak Maclura pomifera'dan elde edilen su ekstresinin'in vivo antiinflamatuvar etkileri ve bu etkilerin oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerini tespit etmeye çalıştık.

Materyal ve Metot. Bu çalışmada ratlarda karrageninle oluşturulan akut inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın antiinflamatuvar etkisi araştırıldı. Hayvanlar sağlıklı, referans ilaç, Maclura pomifera su ekstresi 500 mg/kg, Maclura pomifera su ekstresi 1000 mg/kg ve kontrol grubu şeklinde 5 guruba ayrıldı. Daha sonra tüm gruplardaki inflamasyonlu rat pençeleri çıkarılarak LPO ve GSH miktarları ile SOD ve CAT aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular. Sağlıklı dokularla mukayese edildiğinde kontrol grubunda karrageninin LPO seviyelerini artırarak hasara neden olduğu ve antioksidan parametreleri olumsuz etkileyerek inflamasyonu artırdığı belirlendi. Maclura pomifera su ekstrelerinin'de tüm bu olumsuzlukları düzelterek antiinflamatuvar etki gösterdiği bulundu.

Sonuç. MPSE' nin anti-inflamatuvar etkisi onun antioksidan özelliğini ile yakından ilişkilidir.

Anahtar Kelimeler: İnflamasyon, karragenin, katalaz, Maclura pomifera, pençe ödemi serbest radikaller, rat.

ABSTRACT

Investigating the Antiinflammatory Effects of Water Extratcts of Maclura Pomifera On Carrageenan Induced Acute Inflammation Model In Rats, And Determining Its Antioxidant Mechanism

Aim. In the present study, we aimed to determine the antiinflammatory effects of water extratcts of Maclura pomifera by using carrageenan induced acute inflammation model in rats, and investigate the relationship between antioxidant mechanisms and antiinflammatory effects.

Material and Method. In this study we investigated the antiinflammatory effects of water extratcts of Maclura pomifera on carrageenan induced acute inflammation model in rats, This study was carried out in five groups such as healty, reference drug, 500 mg/kg dose of water extract of Maclura pomifera, 1000 mg/kg dose of water extract of Maclura pomifera, and the control group. Then we determined the LPO amounts, GSH levels, enzyme activities of SOD and CAT in the inflammatory paws of all rats.

Results. It was found that, carrageenan caused damages by increasing LPO amounts and enhacing inflammation via adversely effecting antioxidant parameters when compared with healthy tissues. Water extracts of Maclura pomifera showed antiinflammatory effects by ameliorating all these disadvantages.

Conclusion. The antiinflammatory effects of Maclura pomifera is is closely related with its antioxidant properties.

Key Words: Carrageenan, catalase, free radicals, Maclura pomifera, inflammation, paw edema, rat.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
ASA	: Asetilsalisilik asit
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CAR	: Karragenin
CCl ₄	: Karbontetraklorür
CC ₃	: Triklorometil
COX	: Siklooksijenaz
cGMP	: Siklikguanozin monofosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DIC	: Diclofenac
GİS	: Gastro İntestinal Sistem
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO [•]	: Hidroksil radikali
HO ₂ ⁻	: Peroksit
LO	: Lipooksijenaz
LPO	: Lipit peroksidasyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
IgE	: İmmunglobulin E

IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökın
IND	: İndometazin
MDA	: Malondialdehit
MPSE	: Maclura pomifera'nın su ekstresi
MPx	: Miyeloperoksidaz
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NO	: Nitrik oksit
NO ⁺	: Nitronyum iyonu
NO ₂ ⁻	: Azot protoksit
NO ₂	: Azot dioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
cNOS	: Yapısal nitrik oksit sentaz
INOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endoteliyal Nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NSAID	: Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar
NBT	: Nitro blue tetrazolium
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
PGE	: Prostaglandin
PMN	: Polimorfo nükleer
PUFA	: Poliunsature yağ asiti
RNA	: Ribo nükleik asit

RO [•]	: Alkoksil radikalleri
ROO [•]	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
RSO [•]	: Sülfenil
RSO ₂ ⁻	: Tiyol peroksil radikali
TXA ₂	: Trombosit agregan ajan ve vazokonstrüktör
TNF	: Tümör nekrozis faktör
SAII	: Steroid antiinflamatuvar ilaçlar
SOD	: Süperoksit dismutaz
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Maclura pomifera (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal ağacı	7
Şekil 2.2. Maclura pomifera (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal meyvesi	8
Şekil 2.3. GPx Aracılığıyla Glutatyonun G-S-S-G'ye yükseltgenmesi.....	34
Şekil 2.4. GSH'nin molekül yapısı	36
Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan ratları gösteren fotoğraf.	45
Şekil 3.2. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	50
Şekil 3.3. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	51
Şekil 4.1. Maclura pomifera meyve suyunun 1000 mg /kg dozdaki su ekstralarının karragenin ile uyarılan pençe ödemi üzerine etkisinin sağlıklı ve referans ilaç uygulanan grupların görünümü	54
Şekil 4.2. Maclura pomifera meyve suyunun 500 ve 1000 mg /kg dozdaki su ekstrelerinin karragenin ile uyarılan pence ödemi üzerine etkisi.	55
Şekil 4.3. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstrelerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.4. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstralarının süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.5. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstralarının Glutatyon seviyeleri üzerine etkisi.	59
Şekil 4.6. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstralarının Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı üzerine etkisi	61

1. GİRİŞ

Dünyada yaygın olarak kullanılan ilaçlar arasında ağrı kesici ilaçlar ilk sırada yer alırlar. Bu ilaçlar inflamasyonu önlemeye çalışırken gastrointestinal sistem üzerinde başka bir inflamasyon türü olan ülser gibi istenmeyen etkilere sahiptirler. Ülser ise asrımızın önemli ve yaygın problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnflamasyon tedavisinde kullanılan ilaçların gastrointestinal sisteme verdiği hasarlar en önemli dezavantajları olarak göze çarpmakta ve araştırmacıların bu hasarlara yol açmayacak yeni ilaçlar araştırmasına sebep olmaktadır. Çevremizde yaygın olarak bulunan bazı bitkilerin antiinflamatuvar ve antiülser etkilerinin araştırılması gelecekte bu alanda önemli bir çıkış açacaktır. Bazı bitki türlerinin organik yapıda olmaları ve genel toksikolojik özelliklerinin nispeten zararsız veya az görülmesi bizim için büyük bir avantaj gibi görünmektedir.¹

Bitkilerin etki mekanizması tam olarak açıklanamasa bile ülser üzerinde etkinliğinden dolayı günümüzde kullandığımız birçok ilacın yerine geçebilecek veya ülser üzerinde etkin ilaçlar ile birlikte kullanıldığında bu ilaçların etkinliğini artıracak potansiyele sahiptirler. Bitkisel ilaç ve tedavi yöntemlerinin yeniden artmaya başladığı bu dönemde, kullandığımız bitkilerin, belkide baharatların kullanımı gibi besinlerimize katılması rutin hale gelebilecektir.²

Bu açıdan bakıldığında bu çalışmada Maclura pomifera bitkisinden elde edilen su ekstresinin (MPSE) antiinflamatuvar etkisinin olup olmadığı ayrıca bu bitkiyle ilgili birimimizde yapılan başka bir çalışmada ülseri neden olup olmadığı ve oksidatif süreçte etkili olup olmadığının tespit edilmesi açısından önemli bir devrim niteliği taşımaktadır.³

Ülser, son zamanlarda yaygın sağlık problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmakta ve mevcut tedavi yöntemleri hastaların şikâyetlerini gidermeye yönelik

semptomatik bir tedavi olarak kalmaktadır. Ağrı kesici ilaçların uzun süreli kullanımları gastrointestinal sistemde ve özellikle de midede istenmeyen hasarlara neden olmaktadır. Özellikle de aspirin ve indometazin gibi güçlü antiinflamatuvarlar midede kolaylıkla ülser yapabilmektedir. İndometazinin gastrointestinal sistem üzerine yan etkilerine dair ilk bulgular 1960 'ların sonuna doğru rapor edilmiştir.^{2,3}

1980'li yıllara gelindiğinde ise non steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAI) tarafından uyarılan gastrik hasarların oluşum mekanizması ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Bunlar arasında prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu, lokal kan akışında bir azalmanın olması, topikal tahriş, yeniden yapılanma ve doku onarımının engellenmesi sayılabilir.⁴ 1980'lerin sonu ve 1990'lı yılların başlarında Reaktif oksijen metabolitlerinin gastrik ülser oluşumunun patogeneziindeki rolü ilk olarak iskemi-reperfüzyon tarafından uyarılan gastrik hasarlar üzerine yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir.

Gastrik hasarın midedeki savunma mekanizmasının ve yıkıcı faktörlerin etkileşim sürecindeki düzensizlikten ileri geldiği iyi bilinmektedir. Asit sekresyonu ve koruyucu mukoza bariyerindeki bozukluklara ilave olarak cinsiyet, yaş, kortizon türevi ilaçlar, sigara kullanımı, aspirin ve indometazin gibi NSAI'lar ayrıca *Helicobacter pylori* bakterisinin neden olduğu hastalık bu hasarları meydana getiren faktörlerdir.^{1,5}

NSAI'ların gastrik hasar oluşturmadaki temel mekanizmaların başında ROS miktarını artırması ve prostaglandin miktarını düşürmesi gelmektedir. Bu ROS miktarındaki artış ve buna paralel olarak prostaglandinlerin eksikliği midede gastrik asitlerin, safra tuzlarının ve etanol'ün tahrip edici etkilerini artırmaktadır. Kanamalarda dâhil olmak üzere ROS'nin gastrik ve duodenal mukozaya verdiği tahrip edici etkiler, hayvanlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede araştırılmıştır. İndometazin gibi NSAI'lar kullanılarak oluşturulan deneysel akut gastrik lezyonlarda oksijenden türevli

ROS ve LPO'nun önemli rollerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur⁶. Ayrıca bu çalışmalarda lipid peroksit ve hidrojen peroksitin gastrik mukozal hücelerde birikiminin hızlanmasına rağmen glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığı görülmektedir. ROS'lerin çeşitli reaksiyonlarla dokularda oluşturduğu hasarlar gibi gastrik hasar oluşumunda da birçok reaksiyonda rol aldıkları görülmektedir. Bu yüzden gastrik mukozadaki ülser formasyonunun giderilmesinde antioksidan enzimlerin koruyucu fonksiyonlarının olduğu düşünülmüştür.^{6, 7}

Literatürde bazı bitki ekstrelerinin ve metabolitlerinin antiinflamasyon etkilerinin incelendiği bazı araştırmalara rastlanmıştır. İnflamasyonun önlenmesinde oksidatif süreç üzerinde bu bitkilerin etkili olup olmadığının tespit edilmesi hakkında ise bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda 2003'te Halis Süleyman ve arkadaşları likenler üzerine yaptıkları çalışmada *Lobaria Pulmonaria* liken türünün antiinflatuar ve antiülser etkilerini bulmuşlardır.⁸

2005'te *Usnea longissima*'nın gastroprotektif etkileri ile ülser oluşumunda önemli rol oynayan bazı antioksidan enzimler üzerine etkileri rapor edilmiştir.⁹ 2006'da *Usnea longissima*'dan izole edilen usnik asidin gastroprotektif ve antioksidan etkileri rapor edilmiştir.¹⁰ Yine 2006'da *Usnea longissima*'dan izole edilen difraktaik asidin gastroprotektif etkileri ile oksidatif stresi etkileme süreci literatüre kazandırılmıştır.¹¹

İnflamasyon; organizmada enfeksiyöz, fiziksel, kimyasal ve diğer etkenlerin yol açtığı doku hasarına karşı sellüler ve hümmoral düzeyde oluşan güçlü ve abartılmış bir fizyolojik cevaptır.¹²⁻¹⁴ İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır.

Akut inflamasyon; kısa sürelidir, birkaç dakika ile birkaç gün sürer. Akut inflamasyon, eksudasyon (vasküler) ve lökosit akümülayonu (hüccresel) ile

karakterizedir.^{12, 15, 16} İnflamasyonun bu aşamasında sayılabilecek çok çeşitli faktörlerin arasında bir grubunun da antioksidan sistem olduğu düşünülmektedir.

Akut inflamasyonu kronik inflamasyon izleyebilir. Akut inflamasyon oluşumundan çok kısa bir süre sonra proliferatif hücrelerin oluşması ile inflamasyon kronikleşerek devam eder; ancak bu hücreler yaygın veya granüloma şeklinde olur.¹⁷

Hem akut hemde kronik inflamasyon araştırmalarında çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Karragenin inflamasyon modeli, maddelerin inflamasyonun akut fazına etkilerini araştırmak için, cotton pellet granuloma testi ise inflamasyonun kronik fazına etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır.^{18, 19}

Akut inflamasyonun oluşmasında eikozanoidlerin (araşidonik asit metabolitleri) rolü bilinmektedir.²⁰ Steroidal ve nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların etki mekanizması inflamasyonun kimyasal mediyatörlerinin sentezini inhibe etme esasına dayanmaktadır.²¹

Maclura pomifera, Türkiye’de süs bitkisi olarak yetiştirilen Moracea familyasına ait bir türdür. Bu bitki; yalancı portakal, at elması, sahte portakal, çit elması olarak halk arasında bölgeye göre değişen isimlerle adlandırılır. Ağacının yaprakları ve meyvesi yeşil renkte olup ismini ağacından almıştır.²²⁻²⁴ Maclura türleri yaygın olarak halk ilacı olarak kullanılır. Maclura pomifera ‘nın köklerini kaynatarak Kuzey Amerika’da yaşayan Komanşiler tarafından göz yaralarının tedavisinde kullandıkları bildirilmiştir.^{23,}
²⁵ Bolivya’da bu bitkinin çorbasının diş ağrısının tedavisinde kullanıldığı, yaprakları ve çıkarılan özünün uterus kanamalarında kullanıldığı bildirilmiştir.²⁶ Maclura pomifera ‘nın ayrıca antibakteriyal, antifungal, antiviral, antitümör ve antimalariyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.^{23, 27-29} Maclura pomifera’nın güçlü antioksidan özelliği yapısındaki izoflavinler, osajin ve pomiferinden oluştuğu belirtilmiştir.^{24, 29-31}

Bu araştırmada; ratlarda karragenin ile oluşturulan akut inflamasyon modeli kullanılarak bir Moraceae (Dutgiller familyası) türü olan *Maclura pomifera*'dan elde edilen su ekstresinin in vivo antiinflamatuvar etkileri ve bu etkilerin antioksidant mekanizmalar (CAT ve SOD enzimleri, GSH ve LPO düzeyleri) ile ilişkisi tespit edilmeye çalışıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Moraceae (Dutgiller)

Çoğunlukla odunsu bitkilerdir. Çiçekleri çoğunlukla anemogam (rüzgarla tozlaşan), küçük ve petalsızdır. Sepal ve petal içerdiklerinde küçük ve pulsu ya da belirsizdir. Kuzey yarım kürenin kurak iklim kuşaklarına adapte olmuş ve yaprak döken ormanlar oluşturmuşlardır.

Moraceae 37 cinse ait 1179 tür barındıran tohumlu bitkilerin en geniş familyasıdır. Maclura cinsi bu ailenin en kapsamlısıdır. 36 özel türe sahiptir bu türlerden biride Maclura pomifera (Yalancı Portakal) dır.^{32, 33} Sistematığı şöyledir ;

Alem	:Plantae (bitkiler)
Divisio (Bölüm)	: Spermatophyta (Tohumlu bitkiler)
Subdivisio (Altbölüm)	: Gymnospermae (Açıktohumlular)
Klassis (sınıf)	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae = Çift Çenekli Bitkiler)
Subklassis (alt sınıf)	: Hamamelidae
Familya	: Moraceae (Dutgiller)
Genus (cins)	: Maclura
Tür	: Maclura pomifera (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal. ^{34, 35}

2.1.1. Maclura pomifera (Yalancı Portakal)

Yalancı portakal ağacı (Maclura pomifera), dutgiller (Moraceae) familyasından 20 m'ye kadar boylanabilen geniş tepeli bir ağaç (Şekil 2.1) türüdür .



Şekil 2.1. *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal ağacı

Morfolojik özellikleri

Genç sürgünlerin rengi yeşilimsi-gri veya açık kahverengi olup, çıplaktır ve üzerinde çok sayıda lentiseller bulunur. Sürgünler üzerinde dikenler bulunur. Sürgünler koparıldığında veya kesildiğinde süt görünümünde bir sıvı salgılar. Tepe tomurcuğu pseudoterminaldır. Tomurcuklar küçük, yandan basık, küre biçimindedir ve az sayıda pullarla örtülmüştür. 5-12 cm uzunluğundaki yaprakları uzun damla uçlu yumurta biçimindedir, üst yüzü parlak yeşil, alt yüzü açık yeşildir ve tam kenarlıdır. Bir cinsli iki evcikliktir.³⁴ Çok sayıda çekirdekli sulu meyvelerin bir araya gelmesinden oluşan agregat meyve (bileşik meyve) 10 cm çapında, portakal görünümünde ve yeşil renklidir, (şekil 2.2) ezildiğinde süt salgılar. Taban suyu yüksek olan rutubetli yerlerde görülürse de, değişik toprak tiplerine uyum gösterebilirler. Türkiye'de çit ve süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir.^{23, 36} Vatanı Kuzey Amerika'nın güney batısıdır. Bu bitki; yalancı portakal, at elması, sahte portakal, çit elması olarak halk arasında bölgeye göre değişen isimlerde adlandırılır. Ağacının yaprakları ve meyvesi yeşil renkte olup ismini

ağacından almıştır,^{22, 23} Bu bitki, Türkiye'nin bazı bölgelerinde özellikle Konya, Bursa, Sivas, İstanbul ve Lüleburgaz'da bol miktarda bulunabilir.³⁶

Kimyasal içeriği bakımından *Maclura pomifera* meyve suyunun; %5.88 su, %6.72 kabuk (poça) ,%32.75 yağ, %33.89 protein muhtevisatını oluşturmaktadır. Ayrıca ekstrakta (mg/100 gr yağ) Potasyum, (421.65) Kalsiyum,(218.56) Magnezyum(185.00) bulunmuştur. Yağ asitlerinden linoleik, (%76.19) oleik, (%13.87) stearik (%6.76) ve palmitik asit (%2.44) içerdiği belirtilmiştir.^{24 37}



Şekil 2.2. *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal meyvesi

2.2. İnflamasyon

İnflamasyon ilk kez M.S. I. yüzyılda yaşamış olan Celsus tarafından, kızarıklık, sıcaklık artışı, ağrı, şişme ve fonksiyon kaybı olarak tanımlanmış.^{38, 39} İnflamasyon organizmada enfeksiyöz, fiziksel, kimyasal ve diğer etkenlerin neden olduğu doku

hasarına karşı sellüler ve hümmoral düzeyde oluşan güçlü ve abartılmış bir fizyolojik cevaptır.^{12, 14} Daha ayrıntılı olarak; İnflamasyon; "bir doku hasarına yanıt olarak kan damarları ve komşu dokularda sitolojik ve kimyasal reaksiyonlara yol açan veya morfolojik reaksiyonlarla sonuçlanan lokal reaksiyonlar, zarara yol açan maddenin yok edilmesi veya vücuttan uzaklaştırılması, onarım ve iyileşmeye yol açan yanıtlar gibi anormal uyarılarla tanımlanabilen temel patolojik olay" dır.⁴⁰ İnflamasyona bağlı hücre hasarına ait teorilerin pek çoğunun temeli nötrofil ve lökosit aktivasyonuna dayanır. Nötrofil aktivasyonu serbest oksijen radikallerinin, intrasellüler proteazların ve araşidonik asit metabolitlerinin salınmasına neden olur ve açığa çıkan bu ürünler de doku hasarına yol açar.⁴¹

Aktive nötrofillerden hidrojen peroksit, hidroksi radikalleri ve süperoksit anyonlar gibi toksik miktarda serbest oksijen radikalleri salınır. Serbest oksijen radikallerinin lipid membranda hasarlanma yaparak hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Malondialdehid gibi lipid peroksidasyon ürünleri doku hasarında rol alan serbest oksijen radikallerinin şiddetini yansıtır.⁴¹ İnflamatuvar yanıtın şiddeti, kişisel ve genetik farklılıklar göstermekle birlikte, miyokard fonksiyon bozukluğu, solunum yetmezliği, kanama, karaciğer, böbrek ve nörolojik fonksiyonlardaki bozukluklardan multi-organ yetmezliğine kadar giden postoperatif komplikasyonlara yol açabilir. İnflamatuvar yanıtı ve buna bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltmak amacıyla birçok farklı uygulama denenmektedir.⁴²⁻⁴⁴

İnflamasyonlarla ilgili kabul gören sınıflandırma inflamatuvar prosesin süresi göz önüne alınarak yapılan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre inflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır.^{38, 45}

2.2.1. Akut inflamasyon

Akut inflamasyon eksudasyon (vasküler) ve lökosit akümülayonu (hücresele) ile karakterizedir.^{12, 15, 16}

Vasküler Değişiklikler

Akut inflamasyonun üç temel bileşeni bulunmaktadır;

1. Vasküler çap değişikliğı (vazodilatasyon), kan akımında artış (konjesyon-staz).
2. Mikrovasküler sahada yapısal değişiklikler, permabilite artış.⁴⁶
3. Lökositlerin endoteli geçerek zedelenen dokuda toplanması.⁴⁷

İnflamasyonun en erken fazında çok kısa süreli refleks vazokonstrüksiyon olur.⁴⁸ Bunu takiben arteriol kapiller yatak ve venüllerde oluşan vazodilatasyon meydana gelir.⁴⁸⁻⁵⁰

Vazodilatasyon artışı bölgesel kan akımını artırarak intravasküler hidrostatik basıncı yükseltir. Bu basınç yükselmesi stazı ortaya çıkarır. Staz sonucu ekstrasvasküler dokuya proteinden zengin sıvı geçerek ödemi oluşturur.^{13, 45, 46}

Hücresele Değişiklikler

Akut inflamasyonun ikinci ayağını oluşturan lökosit hareketleri üç aşamada oluşur. Marginasyon denen ilk aşamada lökositler damar içinde periferde doğru yer değiştirerek vasküler endotelle karşı karşıya gelirler. Adezyon kuvvet denen ikinci aşamada lökositler endotele sıkı bir şekilde yapışırlar. Migrasyon aşamasında ise lökositler kemotaktik ajanlar yardımıyla endotel dışına hasarlı bölgeye göç ederler.^{38, 45,}

⁵¹ Lökositlerin bu hakimiyeti ilk 6–24 saat sürerken, takip eden 24–48 saatte bu tablo monositlerin lehine dönüşür.⁵²

İnflamasyonun Kimyasal Mediatörleri:

- 1- Vazoaktif aminler

- 2- Plazma proteazları
- 3- Araşidonik asit metabolitleri
- 4- Lökosit ürünleri (Lizozomal enzimler, sitokinler)
- 5- Diğer türler (Oksijen türevi serbest radikaller)

VazoaktifAminler

Vazoaktif aminlere örnek olarak histamini verebiliriz.

Histamin

Histamin, histidin aminoasitinin dekarboksilasyonu sonucu çeşitli organlarda özellikle de mast hücrelerinde oluşan bir amindir.^{13, 53, 54} Histamin diğer alfa metil aminoasitler gibi vazodilatasyon etkisi nedeniyle antihipertansif etki gösterir.⁵³

Histamin damar dışındaki düz kasları genellikle kasar, nadiren gevşetir. Damarlardaki etkisi arterial dilatasyonu ve venüllerde vasküler permeabilite artışıdır. Birdenbire vasküler permeabilite artışına yol açan venül endotel kontraksiyonu ve endoteller arası hücre bileşkelerinin genişlemesindeki temel mediatördür. Böylece inflamasyonda ekstrasvasküler alana plazma, protein ve sıvı sızmasını sağlar.^{13, 55, 56}

Cilt içine ufak dozda histamin injekte edilmesi Lewis'in üçlü cevabı denilen bir reaksiyonun oluşmasına neden olur.⁵⁷ Bu reaksiyonda histamin tarafından damarların genişletilmesi, kapiller permeabilitesinin arttırılması ve afferent sinir uçlarının stimüle edilmesi rol oynar.^{51, 55}

İnjesiyon yerinde önce bir kızarıklık ve daha sonra kan sıvısının sızması sonucu ödem papülü oluşur. Bu kızarıklık ve onun yerini alan papül, üçlü cevabın iki ögesini oluşturur. Üçüncü öge ise papül çevresinde oluşan nispeten geniş bir alana yayılan ve dış sınırı düzensiz olan hale şeklindeki kızarıklıktır.⁵⁶

Serotonin

Serotonin ya da diğ er adıyla 5-HT (5-Hidroksitriptamin) temel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir.^{58, 59} Serotonin sentezinin başlangıç ve hız kısıtlayıcı enzimi triptofan hidroksilazdır.⁵⁸ Yetişkin bir insanda ortalama 5-10 mg serotonin bulunmaktadır. İntestinal mukozada bulunan enterokromaffin hücrelerde lokalize olmuştur. Serotonin burada düz kasları stimüle ederek gastrointestinal motiliteyi arttırır.⁵⁹ Kandaki tüm serotonin trombositlerde depolanır. Trombositlerde serotonin sentez edilmez, trombositler serotoninini plazmadan alırlar ve depolarlar. Trombosit agregasyonu ile salınımı uyarılır.¹³ Serotoninin lokal enjeksiyonu o bölgede inflamasyona yol açar.⁶⁰

2.2.2. Kronik İnflamasyon

Kronik inflamasyon aktif iltihap ve iyileşme süreçlerinin birlikte görüldüğü uzun süreli bir inflamasyon olarak kabul edilir.^{13, 61, 62} Kronik inflamasyon akut inflamasyonu izleyebilir. Bu geçiş zedeleyici etkenlerin ısrarla devam etmesi veya iyileşme proseslerinde bozukluklar nedeniyle ortaya çıkar. Zedelenmenin bazı türlerinde ise zedeleyici etkene karşı yanıt başlangıçtan itibaren kronik inflamasyondur. Kronik inflamasyonu ortaya çıkaran zedeleyici etkenler akut inflamasyon yapanlardan daha az toksik olmalarına rağmen, iyileştirme proseslerinde bir yetersizlik olması daha uzun süren bir zedelenmeye neden olabilir. Fibrozis birçok kronik inflamatuvar hastalığın ortak özelliğidir ve organ disfonksiyonunun önemli nedenlerinden biridir. Kronik inflamasyon; inatçı infeksiyonlar potansiyel toksik ajanlara uzun süre maruz kalma ve otoimmün hastalıklar sırasında oluşabilir.^{63, 64}

2.3. Anti-inflamatuvar İlaçlar:

2.3.1. Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (SAEI)

Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar NSAİİ'a göre daha belirgin anti-inflamatuvar etki oluşturlar.⁶⁵ Bu etkileri muhtemelen; lizozomal membran stabilizasyonu, kapiller geçirgenliğin azalması, lökositlerin inflamasyon alanına göçünün önlenmesi, hasarlı hücrelerin fagositozunun (özellikle T lenfosit yapımının azalması) ve lökositlerden IL-1'in salınımının inhibisyonuna bağlıdır. Kortizol; INOS, COX ve fosfolipaz A2'nin sentezini baskılar.^{66, 67} Fosfolipaz A2 aktivitesini, dolaylı yoldan, bir inhibitör protein olarak bilinen lipokortinin salınımını artırarak baskılar.^{68, 69} Fosfolipaz A2 inhibisyonu, araşidonik asit salınımını azaltarak, PG'ler, tromboksanlar, ve lökotrienlerin oluşumunu da inhibe eder ve SAIİ'nin anti-inflamatuvar etkisinin en önemli mekanizmasını oluşturur.⁷⁰

2.3.2. Non Steroidal Anti-inflamatuvar İlaçlar

Klasik NSAİİ ağrı, ateş, kızarıklık ve ödemin giderilmesinde etkili oldukları için inflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde en fazla tercih edilen ilaçlardır.^{71, 72} Bu ilaçların anti-inflamatuvar etkileri, SAIİ'inkinden daha düşüktür. Fakat yukarıda belirttiğimiz üç etkinin bir arada bulunması NSAİİ'nin kullanımını oldukça artırmıştır. Ayrıca günümüzde inflamasyon, ağrı ve ateşte NSAİİ'nin öncelikli kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri de narkotik analjezikler gibi bağımlılık yapmaması ve etkilerine karşı tolerans gelişmemesidir.^{73, 74}

NSAIİ ilk kez 1820'de kolşisin, 1860'da salisilik asitin tanımlandığı ve ilk Aspirin tabletinin 1898'de sentezlendiği dikkati çeker.⁷⁵ NSAİİ isminin 1949'da ilk kullanılışı fenilbutazon' un sentezlenmesi ile eş zamanlıdır. 1971'de bu serüven Dr. John Wyane'in etki mekanizmaları konusunda yaptığı çalışmalar ve ilk siklooksijenaz

enzimini tanımlaması ile yeni bir boyut kazanırken, John Wyane'e de Sir ünvanı ve Nobel yolu açılmıştır.⁷⁶ 1976'da ise, serüvende yeni bir durak olan, prostaglandin endoperoksit sentetaz (siklooksijenaz = COX) enzimi elde edilmiş, böylece NSAII'nin etki mekanizmaları, yan etkileri ve güvenlik profili üzerine olan çalışmalar hızlanmıştır. Bu konuda son gelişme 1990'lı yılların başında COX'un tek bir molekül olmadığını birden fazla izomerlerinin bulunduğunu ve her bir izomerin farklı işlevlerde rol aldığı gösterilmiştir. Böylece klinik çalışmalarda yeni bir boyut kazanmıştır.^{77, 78}

NSAII'nin Sınıflandırılması

1. Salisilatlar: Asetil salisilik asit, salisilik asit, metil salisilat ve Sodyum salisilat, Diflunisal

2. Paraaminofenol türevleri: Asetaminofen, Fenasetin

3. Pirazolon türevi ilaçlar: Aminopirin, Propifenazon, Metamizol sodyum, Fenilbutazon, Oksifenbutazon

4. Profenler (Fenilropionik asid türevleri): İbuprofen, Naproksen, Fenbufen, Tiaprofenik asid, Ketoprofen, Fenoprofen kalsiyum, Flurbiprofen, İndoprofen, Zomepirak

5. Fenilasetik asid türevleri: Nabumeton, Fenklofenak, Diklofenak sodyum

6. İndol asetik asid türevleri: İndometazin, Asetmetasin, Tolmetin, Ketorolak, Sulindak

7. Fenamik asid türevleri: Mefenamik asid, Flufenamik asid, Etofenamat

8. Oksikamlar ve diğer ilaçlar: Piroksikam, Tenoksikam, Prokuazon, Azapropazon Metotrimeprazin

9. COX-2 inhibitörleri: Meloksikam, Nimesulid, Etodolak, Selekoksib, Rofekoksib⁷⁴

Yukarıdaki ilaçlar, analjezik olarak kullanıldıklarında, genellikle diş ağrısı gibi hafif şiddette ağrılara karşın etkin olurlar.⁷³ NSAII ateşli durumlarda vücut sıcaklığını düşürürler, fakat normal vücut sıcaklığını değiştiremezler.⁷⁹ Sonuç olarak NSAII sadece hastalıktan kaynaklanan inflamasyon ve ağrıların yarattığı semptomlarda rahatlamayı sağlar fakat hastalığın dokulara verdiği patolojik zararın ilerlemesini engelleyemez.

Ayrıca non-selektif NSAII'ın hamilelikte kullanımı, intrauterin duktus arteriosusun prematüre kontraksiyonuna sebep olabilir. Fetal dönemde COX-1 ve COX-2 tarafından sentezlenen prostaglandinlerin (vazodilatatör PG), duktus arteriosusun açıklığını sürdürmesinde etkili olduğu da belirlenmiştir. Menstrüasyon döngüsünde endometrium tarafından salınan prostaglandinler, primer dismenoredeki diğer semptomların ve sert krampların nedeni olabilir, bu durumun tedavisi ise NSAII ile yapılmaktadır.⁸⁰

PGE2' in bazı kanserlerdeki humoral hiperkalsemi ile ilişkili olduğu da bulunmuştur. NSAII ile tedavi bazı hastalarda serum kalsiyum düzeylerini etkili bir şekilde düşürmektedir.⁸¹

NSAII'ın önemli bir kullanım alanı da kolon kanseridir. Kolon kanserinin önlenmesinde etkindir. Epidemiyolojik çalışmalar sık olarak aspirin kullanımının kolon kanserinin insidansında önemli ve çarpıcı bir azalma meydana getirdiğini göstermektedir.⁸²

2.4. Antioksidanlar

Organizmada, fizyolojik ve metabolik süreçlerin sonucu olarak reaktif oksijen türleri üretilmekte ve zararlı oksidatif reaksiyonlar oluşmaktadır . Hücreler de bu olaylara karşın, oksidanları toksik olmayan moleküllere çeviren, bu şekilde organizmayı oksidatif hasardan koruyan enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler geliştirmişlerdir.⁸³ Bu savunma sistemlerine genel adıyla antioksidanlar denmektedir. Potansiyel toksik oksijen türleri

yapmaya yetkin kimyasal bileşikler ve reaksiyonlar da pro-oksidan olarak adlandırılır .Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen tüm maddelerdir ki bu oksidanların direk etki ile inaktivasyonunu ifade eder.^{54, 84} Bir başka deyişle peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve/veya reaktif oksijen türlerini tutan maddelerdir.⁸⁵ Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedirler. Bunlar;

1- Oksidanları tutarak toksik olmayan ürünlere dönüştürme işlemi ki bu daha çok antioksidan savunma enzimlerince yapılır.

2- Serbest radikal zincir tepkimelerinin sonlandırıldığı, oksidanlara bir H^+ aktararak etkisizleştirme. Bu da enzimatik olmayan savunma sistemlerinden vitaminler ve flavonoidler gibi bileşiklerce yapılır.

3- Hasar onarıcı sistemler, burada sözü edilen ise hücrede DNA için onarım mekanizmaları ve okside olmuş yağ asitlerini zar lipidlerinden uzaklaştıracak mekanizmalardır. Proteinlerdeki okside olmuş amino asitler, proteinin yıkılması ve yeni protein sentezi ile sürekli onarılır.

4- Metal sekestrasyonu; bu daha çok metal iyonlarının oksidan moleküllere ya da protein yapılarına bağlanarak olası zincir reaksiyonların engellenmesi ile oluşmaktadır.

Bunun yanı sıra bazı tür reaktif oksijen türlerini üreten enzimlerin, antioksidan enzim taşıyan peroksizomlara hapsedilmesi gibi uzaklaştırıcı etkiler de mevcuttur.^{52, 54, 86}

Antioksidan moleküller doğal antioksidanlar ve doğal olmayanlar (ilaçlar) olmak üzere iki genel grupta incelenir. Doğal antioksidanlar da enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri alt başlıklarında incelenebilir.⁵² Enzimatik olmayan savunma sistemleri, serbest radikalleri enzimatik olmayan tepkimelerle radikal ve toksik olmayan şekillere çevirirler. Bunların çoğu radikale bir hidrojen atomu (bir elektronla birlikte) bağışlayarak serbest radikali nötralize eden antioksidanlardır. Bu tepkimelerle antioksidanlar okside olurken serbest radikal miktarını azaltırlar.⁵² Doğal antioksidanların

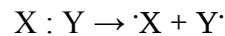
enzimler başlığı altında glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz sayılabilir. Enzimatik olmayan ancak doğal sayılan antioksidanlar arasında transferrin, seruloplazmin, ürik asit, bazı vitaminler, karotenoidler ve fenolik yapılar gibi moleküller sayılabilir. Doğal olmayan ilaç etkili antioksidanlara ise mannitol, trimetozidin, barbitüratlar, indapamid gibi örnekler verilebilir.

2.4.1. Serbest Radikaller

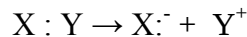
Serbest radikaller orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron barındıran atom veya moleküllerdir. Elektronlar atomlar içerisinde orbital olarak bilinen bölgelerde en fazla iki tane olacak şekilde ve birbirlerine zıt konumda bulunmaktadır. Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler buna rağmen bazı atom kombinasyonları (nitrit dioksit, nitrik oksit) bir orbitalinde tek elektron bulunduran dağılımları nedeni ile radikal özellik gösterirler.

Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dizilişleriyle birlikte termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri de değerlendirilmelidir. Serbest radikaller üç yolla oluşur.⁸⁷

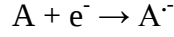
1. Hemolitik bağ ayrılması ve bir elektronun bir molekülden diğerine transfer edilmesi sonucu oluşan serbest radikallerdir. En yaygın görülen serbest radikal oluşumu hemolitik bağ ayrılmasıdır.



2. Bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron atom veya atom gruplarının birinde kalır.



3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşan serbest radikaller.



Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olur.

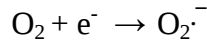
Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleride yer almaktadır. Oksijenli (Aerobik) solunum yapan canlılar dışarıdan aldıkları besin maddelerini oksitleyerek organizma canlılığının devamı için gerekli kimyasal bağ enerjisine yani ATP' ye çevirirler.

Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu nedenle aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar.⁸⁸

Serbest Radikal Çeşitleri

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$)

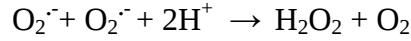
Oksijen molekülünün içerdiği iki serbest elektrondan bir tanesini dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur.



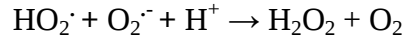
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksit radikalının eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilerek radikal oluşunu artırdığı bilinmektedir.⁸⁸

Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olurlar. Çünkü SOD enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksit (H_2O_2) çevrilir. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil ($HO_2^\cdot$) radikallerini üreten spontan reaksiyona uğrar. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır.⁸⁹

İki süperoksit radikalının bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



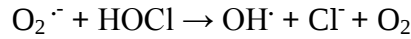
Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.



Süperoksit radikalının nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir.⁹⁰

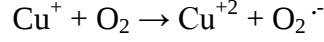
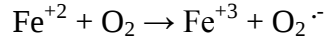


Hipoklorik asit ($HOCl$) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan hidroksil ($OH^\cdot$) radikalının oluştuğu görülmüştür.⁹¹



Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redüktan olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksit

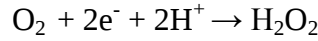
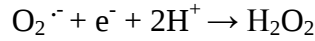
indirgenir⁹². Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.



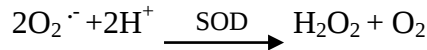
Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir.⁹³

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

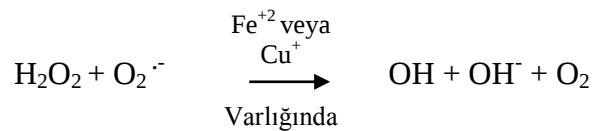
Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdan iki elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir.⁸⁴



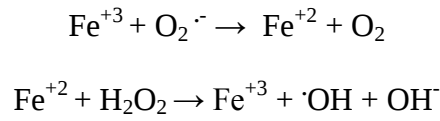
Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksitin asıl kaynağı herhangi bir sistem tarafından üretilen süperoksit radikalının dismutasyon reaksiyonudur. Ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler iki elektronunu oksijene vererek H₂O₂ oluştururlar.



Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidant özelliği gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutation peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir. H₂O₂ serbest bir radikal olmadığı halde, ROS içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.⁸⁴

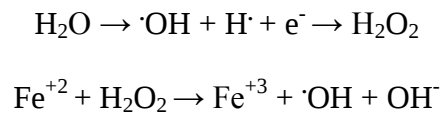


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir; ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe^{+2}) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir.^{94, 95} Reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.

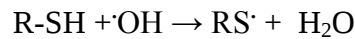


Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derece reaktif oksidan radikaldir. Hidroksil radikali özellikle biyolojik moleküller üzerine saldıran ve olduğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça hareketli bir oksidandır.⁹⁶



Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparır. Bunlardan birisi de tiollerdir.



Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek tiyol peroksil (RSO_2) ve sülfenil (RSO) gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

Bekli de $\text{OH}^\cdot$ en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu stimüle etmesidir. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipid zincirinin yağ asidi tabakasına atak yapması ile meydana gelir. Ayrıca hidroksil radikalının araşidronik asit gibi doymamış yağ asitlerine olan ilgisinin de fazla olduğu ileri sürülmektedir.

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

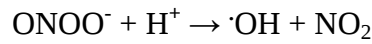
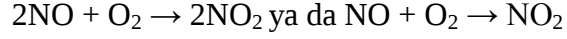
Singlet oksijen eşleşmemiş elektron ya da elektronlara sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer ROS ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir.^{88, 97}

Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve nitrojen dioksit ($\text{NO}_2^\cdot$)

Nitrik oksit ve nitrojen dioksit eşleşmemiş elektronları ile birer radikaldirler. Nitrojen dioksit, nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir. NO_2 oldukça zehirli ve çok güçlü bir oksidandır. Oksijen redüksiyonu sırasında NO_2 'ye maruz kalması durumunda araşidronik asit metabolizmasının NO_2 konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Düşük miktarda NO_2 'nin araşidronik asit metabolizmasını büyük oranda artırdığı gözlenmiştir.^{84, 98, 99}

Nitrik oksit L-arjinin amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Son yıllarda radikal olan nitrik oksit

üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturmaktadır. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.⁹⁹⁻¹⁰¹



Diğer Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}^{\cdot}$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}^{\cdot}$), alkoksil radikalleri ($\text{RO}^{\cdot}$), tiyol radikalleri ($\text{RS}^{\cdot}$) gibi önemli serbest radikallerde oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil ($\text{RSO}^{\cdot}$) veya tiyol peroksil ($\text{RSO}_2^{\cdot}$) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler.

2.4.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller organizmanın normal yaşamını sürdürmesi için gerekli olan metabolik faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli olan reaksiyonların sonunda oluşabildiği gibi stress ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen radikal kaynakları olmak üzere ikiye ayrılır.

Eksojen radikal kaynakları

- İlaç oksidasyonları
- Radyasyon

- Güneş ışığı, UV-ışınları
- Sigara dumanı, egzoz gazları
- Kükürtdioksit
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksit, pestisitler, solventler, anestezi maddeleri, aromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotikler.
- Stres: Stresin katekolamin düzeyi artırması ve katekolaminlerin oksidasyonu ile serbest radikal oluşumu gözlenir.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Endojen radikal kaynakları

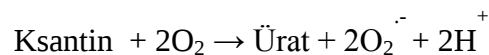
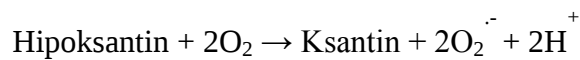
a. Küçük moleküllerin otooksidasyonu

Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiyopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur.^{104, 105}

b. Enzimler ve proteinler

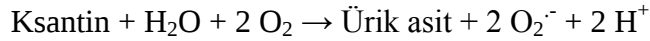
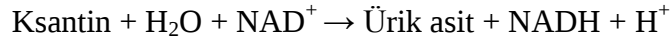
Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar.^{102, 106}

Ksantin oksidaz normalde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz; fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürat'a oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir.^{107, 108}



Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir; fakat yapılan araştırmalarda, ksantin oksidaz enziminin barsak, akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu gözlenmiştir.^{109, 110}

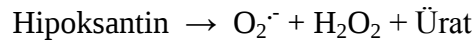
Normalde NAD bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz; ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da, Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur.^{87, 111}



XD

$Ca^{++} \downarrow$

XO



$\uparrow$

O_2

Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler.¹¹²

c. Mitokondriyal elektron taşınması

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADH)-dehidrogenaz basamağında, ikinci olarak koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi, oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak O_2 'nin %1-3'ü, elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalinin üretimini artırır. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenosin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretime etki eder.^{2, 113}

d. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b_5 , doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.

e. Peroksizomlar

Peroksizomlar oldukça önemli sitozolün hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar O_2^- üretmeden, bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar.

Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir.¹⁰²

f. Plazma membranı

Plazma membranı serbest radikal üretimi için kritik bir yer oluşturmaktadır. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentlerine ulaşmadan önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bu geçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membranda yer alan fosfolipidler, glikolipidler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden anında etkilenirler. Lipid peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu membran permeabilitesinde bozukluklar meydana gelmektedir.^{114, 115}

Hidrojen peroksit, membranları neredeyse su kadar kolay geçebilen güçlü oksidandır. Bu nedenle proteinlerin ve lipidlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisinin daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Serbest radikallerin nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidad aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir.¹¹⁶

Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi plazma membranıyla bağlantılı enzimler ile mikrozomlar tarafından serbest radikal üretimi, bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asit metabolizması ile ilişkili pek çok yeni buluş ve biyolojik açıdan önemli ürünlerin meydana gelmesinden dolayı ilginçtir.

Bu ürünler PG'leri, tromboksanları, lökotrienleri ve anaflaksinin slow-reakting substratını içerir. Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik proseslerin otokatalitik LPO'nun öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır. Serbest radikal üretimini bazı toksik maddeler artırabilir. Bu maddeler dört gruba ayrılır.^{102, 117}

1- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.

2- Toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin toksik bir madde olan karbontetra klorür (CCl₄) karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil (CCl₃)

serbest radikale dönüştürülür. Bu radikalın oksijenle reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen peroksil radikali güçlü lipid peroksidasyonu başlatıcıdır.

3- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun en basit örneği paraguattır.

4- Toksin antioksidan aktiviteyi düşürebilir. Parasetamol karaciğerde sitokrom P-450 tarafından GSH ile reaksiyona girip miktarını azaltan bir ürün oluşturur.

2.4.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar ve proteinlere saldırarak gösterirler. Mitokondride oksijenli solunum sonucunda meydana gelen serbest radikallerin alveolar epitel tabakada ve DNA'ya zarar vererek yapısal ve metabolik çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu bilinmektedir

Membran lipidleri üzerine etkileri

Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden bir çok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalının membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.^{102, 118, 119}

Lipid peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran ya da polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan ($-\text{CH}_2-$) bir hidrojen ($\text{H}^\cdot$) atomunun çıkartılması ile başlar. Böylece tek elektron içeren $\text{H}^\cdot$ 'nin uzaklaştırması sonucu karbon merkezli -

·CH- lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H[·] parçacığı ile birleşerek lipid hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder ve zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur.^{100, 104}

Lipid hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca lipid hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısıyla reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler, iyon transportunu etkileyebilirler.^{85, 117, 120}

LPO reaksiyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder.⁸⁴

LPO sonucunda membran yapısında çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar kısaca.¹²¹ Membran üzerindeki yağ asiti miktarında azalma meydana gelir

- 1- Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid hidroperoksitleri biomembranlar üzerinde yerleşmiş halde bulunan bazı enzimleri inhibe eder.
- 2- Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein-lipid ilişkisini bozar
- 3- Membranın yapı taşlarından olan lipidlerin akışkanlığını bozar
- 4- Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli yapısal moleküllerde bozulmalara neden olurlar.

Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, lipidlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin (PCO) ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir.^{102, 122}

Proteinlerin çok farklı şekillerde modifikasyona uğramasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit miktarı, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise geniş çaplı özellik taşır ve çok sayıda amino asitte değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine dönüşümü, geniş

aplı modifikasyonlara ise arginin, lizin ve tirozin amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir.^{123, 124}

DNA zerine etkileri

İyonize edici radyasyondan kaynaklanan hücre ölümünün başlıca nedeni olarak nükleik asitlerin ROS ile reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucunda DNA'da mutasyona ve hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan melanoaldehit (MDA)'in nadirde olsa DNA'da mutasyona sebep olduğu, beslenme ve yaşam şekli gibi faktörlerle bir araya gelerek kanser ve genetik bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir.^{125, 126}

Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar. Hidroksil radikali Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer.^{127, 128}

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. ROS, DNA'nın oksidative hasarı sonucu karsinogenesis ve çeşitli hastalıklar görülebilir.^{125, 126, 129, 130}

Doğal (Endojen) Antioksidanlar

A. Primer Antioksidanlar (Enzimler)

Doğal bir süreç halinde seyreden oksidatif stres tüm canlı sistemlerde, çeşitli basamaklarda oluşmaktadır. Bu durumu kontrol altında tutan antioksidan mekanizmalardan biri de enzimler olmaktadır. Aşağıda çalışmamızda kullandığımız antioksidan parametreler içinde olan enzimlere değinilecektir.

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi ilk kez 1969'da Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır.¹⁰⁵ Serbest radikallerden olan süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren bir metalloenzimdir. Bu reaksiyona dismutasyon adı verilir ve çoğu kez oksidatif strese karşı birinci savunma hattı olarak adlandırılır.^{86, 131} Süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bu enzim, beyinde yaygın bir şekilde bulunur ve aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. İnsanlarda iki tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden CuZnSOD ile mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden MnSOD.^{132,133} izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri (FeSOD) ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu, Zn-SOD dir. Cu, Zn-SOD ilk defa, 1969'da, Mc Cord ve Fridovic tarafından hayvan, bitki dokuları ve mayadan saflaştırılmış ve tanımlanmıştır.

Molekül kütlesi 32.000 Dalton'dur. İki alt ünitesi vardır ve bunların her birinde bir Cu ve bir Zn atomu bulunmaktadır. Ayrıca her alt birimde bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir de asetillenmiş terminal amino grubu bulunmaktadır. Cu/Zn-SOD enziminin ayrı formları bulunmaktadır. Sitoplazmada bulunanın dışında bazı hayvanların plazmasında 130.000 Dalton molekül kütleli Cu/Zn-SOD bulunduğu

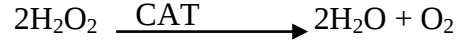
tespit edilmiştir.¹³⁴ Mn-SOD mitokondrial bir enzimdir ve prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk kez 1970 yılında Keele ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. Buradaki mangan +3 değerliklidir ve iki alt birimden oluşmuştur. Her alt birimde bir Mn atomu vardır ve 23.000 Dalton molekül kütlesine sahiptir. Mitokondrial SOD hemen hemen total SOD'nin % 60 'ını içerir. Zira süperoksit sitozole göre mitokondride hemen hemen iki kat daha fazla oluşur. Tüm SOD'ler fizyolojik şartlarda süperoksit karşı etkin bir koruma sağlarlar.¹³⁵ Her iki enzimin katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır.^{105,136}

Normalde metabolizma sırasında hücreler tarafından fazlaca süperoksit üretilmesine rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler düzeyleri düşük tutulur. SOD fagosit edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla oranda SOD bulunur.¹³⁷

Katalaz (CAT)

İlk defa doğada yaygın bir şekilde mevcut olduğu 1901'de O. Leew tarafından tespit edilmiştir. 1937'de Summer ve Dounce tarafından karaciğerden kristal formda ilk kez izole edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 Dalton'dur. Dört alt üniteden oluşmuştur. Peroksizomlarda, lizozomlarda ve mitokondride bulunur. Kandaki katalaz aktivitesi büyük ölçüde eritrositlerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle insan eritrositleri katalaz yönünden çok zengindir. GPx esas olarak mitokondri ve sitozolde bulunurken, katalaz peroksizomlarda bulunur. Eritrositlerde mitokondri olmadığı halde yüksek aktivitede CAT ve GPx vardır. Katalaz 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir.¹³⁶

Büyük moleküllü lipit hidroperoksidlere etki etmezken, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar.⁵⁶

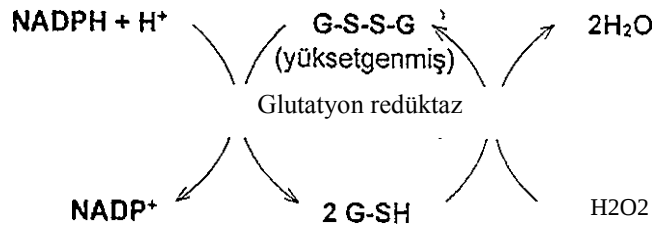


Glutasyon peroksidaz (GPx)

Hücre içinde esas olarak sitozol ve mitokondride yer almakta ve peroksizomlar dışında oluşan hidrojen peroksitin giderilmesinde ana araç olarak kullanılmaktadır. Glutasyon peroksidaz prostetik grup olarak selenyum içeren ve peroksitleri inaktive ederek etki gösteren bir enzimdir. Selen enzimleri ailesinde bulunan GPx aktivitesinin, selenyum eksikliğinde, azalmasına bağlı olarak peroksidatif hasar oluşumunda artış gözlenmektedir.^{53,}

86, 138

Eritrositlerde ve diğer dokularda GPx, H_2O_2 ve lipit hidroperoksitlerin etkisizleştirilmesinde redükte glutasyonun yükseltgenmesin de gerçekleştirerek membran lipitleri ve hemoglobini peroksitlerin oksidatif hasarına karşı korur . Bu esnada okside olarak yükseltgenmiş glutasyon, glutasyon redüktaz aracılığıyla indirgenir. Burada pentoz fosfat yolu kaynaklı NADPH kullanılır. Ve NADPH'den elektron aktarımıyla glutasyon indirgenmiş hale dönüşür. Bu da GPx tarafından kullanılarak H_2O_2 suya dönüştürülmek suretiyle inaktive edilir.^{86, 92, 138}

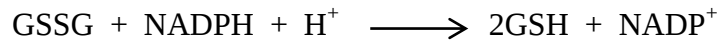


Şekil 2.3. GPx Aracılığıyla Glutasyonun G-S-S-G'ye yükseltgenmesi

Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz 50.000 daltonluk alt birimlere sahip bir dimerdir. Görevi yükseltgenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirmektir. Bu indirgenme işlemi sırasında NADPH'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfid bağına direkt olarak transfer edilemezler. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan FAD'ye transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyonla aktarılmış olurlar. Her bir subunit 3 tane yapısal alan içerir, bunlar: FAD bağlayıcı olan, NADPH bağlayıcı olan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı ve NADP⁺ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrojenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara benzerler.

FAD ve NADP⁺'nin izoalloksozin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde geniş ölçüde aralarında bağlanırlar. Oksidize glutasyon için bağlayıcı alanın bir alt biriminin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği belirtmek gerekir.¹³⁹



Alyuvarlardaki pentoz fosfat yolu ise, GR'nin GSSG'yi GSH'ye çevrimi için gereken NADPH'ı sağlar.⁵³

Glutasyon S-Transferaz (GST)

Antioksidan aktivitede önemli bir rol oynayan indirgenmiş glutasyon (GSH), kendisinden başka moleküllerdeki sülfhidril gruplarının korunmasını sağlayarak denge unsuru oluşturur. GSH serbest radikallerin, H₂O₂ ve diğer peroksitlerin inaktive edilmesine katkıda bulunur, çeşitli yabancı bileşiklerin inaktivasyonu da sülfür atomunun bu bileşiklerle birleşmesiyle sağlanır. Bu birleşme reaksiyonu glutasyon S- transferaz enzimi tarafından katalize edilir ve en son merkapturik asit oluşarak ekskrete edilir.

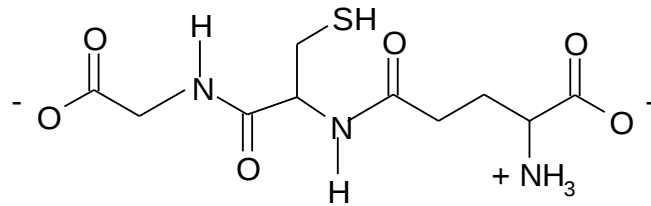
Sitozol ve mitokondride bulunan mikrozomal proteinler içeren bir enzimdir. GST çeşitli substrat moleküller üzerindeki elektrofilik noktalar üzerine redükte glutatyonun sülfhidril grubunun konjugasyonunu sağlar. Bu olay lipid peroksidlerin detoksifiye edilmesi için gereklidir. GST'nin ayrıca transport proteinleri olarak görev yapma ve önceleri "ligandin" adıyla anıldığı gibi toksinleri bağlama fonksiyonları da vardır.⁸⁶

B. Sekonder Antioksidanlar (Enzim Olmayanlar)

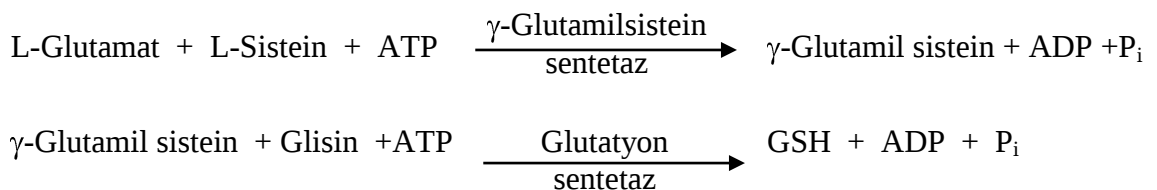
Lipit fazda bulunanlar antioksidanlar α , β , γ (-) tokoferoller (E vitamini) ve β -karoten'dir. Sıvı fazda (hücre sitozolü veya kan plazmasında) bulunanlar ise askorbik asit, miyoglobulin, melatonin, hemoglobin, üre, ferritin, sistein, metionin, seruloplazmin, albümin, laktoferrin, bilirubin ve glutatyon'dur.

Glutatyon (GSH):

GSH, birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir: γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin (Şekil 2.6). GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir. Oluşan her peptid bağı için bir molekül ATP harcanır¹⁴⁰.



Şekil 2.4. GSH'nin molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki sergiler ve H_2O_2 'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H_2O_2 birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğer dokularda ise bu sitokrom P 450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur.^{53, 140, 141}

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH'yi peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz¹⁴². GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir.¹⁴³

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur.

Örneğin GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden vitamin C, E ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir.⁵⁸

Birçok enzimin şayet sistein tiyol grubu ($-SH$) oksitlenecek olursa inaktive ya da inhibe olur. GSH, Gama-glutamilsisteinilglisin, duyarlı ve esansiyel $-SH$ gruplarını içeren enzimlerin doğal aktivatörüdür. Glutatyon hücrede bir ko-enzimden ziyade var

olan amino asit öncüllerinden kolayca sentezlenen doğal bir antioksidandır. Fenilalanin ve tirozinin oksidatif yıkımında görev alan maleilasetoasetat izomeraz da dahil olmak üzere glutatyon çok az sayıda enzim için spesifik bir koenzimdir. Glutatyonun hücre içi derişimi kontrol edilerek birçok enzimin aktivitesi düzenlenebilir¹⁴³.

C. Diğer Sekonder Antioksidanlar

İnsan vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına karşın vitaminlerin vücuttaki etkinlikleri oldukça fazladır. Bunların bir bölümü, besinlerle aldığımız karbonhidrat, yağ ve proteinden enerji ve hücrelerin oluşması ile ilgili biyokimyasal olayların düzenlenmesine yardımcı olurlar. A, E ve C vitaminleri vücut hücrelerinin hasarını önleyerek normal işlevlerini sürdürmeleri ve bazı zararlı maddelerin etkilerinin azaltılmasında (Antioksidan etki) yardımcı olurlar. Antioksidanlar, hücremizi, serbest radikalleri nötürleştirerek korurlar.

Bunlar uyum içerisinde çalışan bir takım gibi radikalik saldırılara karşı koyarlar. β -Karotenin, askorbik asitin ve tokoferolün antioksidan etkileri yıllardan beri bilinmektedir. β -Karoten organizmada A vitaminin parsiyal oksijen öncülü olmasının yanı sıra bir antioksidan olarak görev yapar. Bununla beraber, 15 torr'da 150 torr'dan daha iyi antioksidan olduğu, 760 torr'da ise prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir. Hücrelerin dışında bulunan β -Karoten; hücre duvarından, içeri girmek isteyen saldırganlara karşı savunmayı ise eser elementlerden selenyumun da yardımıyla E vitaminini üstlenmiştir. Suda çözünen vitaminlerden birisi olan askorbik asit yapı itibarıyla en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Yüksek yapılı hayvanların pek çoğu ve bitkiler kolayca askorbik asidi glukozdan sentezleyebilmektedir. Hücre içerisindeki C vitamini serbest radikallere son darbeyi vurmakta ve bu şekilde radikallerin tesirleri ortadan kaldırılmaya çalışmaktadır.

E vitamini yağda çözünen bir vitamin olup temel görevi lipitleri oksidatif

hasardan korumaktır. İnce barsaklardan kolayca emilir ve vücudun tüm dokularına taşınarak hücre membranları etrafında depolanır. Böylece hücre membranında koruyucu bir tabaka oluşturmuş olur.¹⁴²

Ekzojen Antioksidanlar

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri: Tungsten, allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehit

2. Soya fasulyesi inhibitörleri: Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.

3. NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, cetiedil, difenilin iyodonyum

4. Rekombinant süperoksit dismutaz

5. Troloks-c : E vitamini analogu

6. Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler: Glutasyon peroksidaz aktivitesini artırır. Bunlar; Ebselen ve Asetil sisteindir.

7. Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol ve albümin

8. Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferroksamin ve seruloplazmin

9. Nötrofil adezyon inhibitörleri

10. Sitokinler: Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve Interlökin - 1

11. Barbitüratlar

12. Demir şelatörleri.¹³⁷

Gıda Antioksidanları

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Sodyum benzoat

- Etoksiguin
- Propilgalat
- Fe - superoksid dismutaz.¹³⁷

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Enzim ölçümlerinde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company(Germany)'den temin edilmiştir. İnflamasyon deneylerinde kullanılan ilaçlar ise;

indometazin : (Endol kapsül 25 mg) Deva ilaç

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 32 R
UV-Visible EIA Spektrofotometre	: Biotech epoch
pH metre	: Thermo Orion Star III
Hassas terazi	: Denver
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Magnetik karıştırıcılar	: Heildolpf
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Buzdolabı	: Beko
Saf su cihazı	: GFL 2012
Çalkalayıcılı su banyosu	: GFL
Homojenizatör	: Ika-T-18 Ultraturrax

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. CAT homojenat tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton x-100 içeren Fosfat Tamponu)

1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton x-100 alınarak 200 ml saf suda çözüldü. pH 7.8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

2. CAT ölçüm karışımı (40 mM pH 7.0'de H₂O₂ içeren 50 mM Fosfat Tamponu)

1020 µl H₂O₂ ve 1.7 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

3. SOD homojenat tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu)

1.7 g KH₂PO₄ ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

4. SOD ölçüm karışımı

A – 0.3 mM Ksantine: 0.0018 g ksantine alınarak hacmi distile su ile 40 ml'ye tamamlandı.

B – 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alındı ve hacmi distile su 20 ml'ye tamamlandı.(2 damla 5 M NaOH ile çözünür)

C – 150 µM NBT (Nitro blue tetrazolium): 0.0024 g NBT alınarak 20 ml distile suda çözüldü.

D – 0.4 M Na₂CO₃: 0,5088 g alınarak 12 ml distile suda çözüldü.

E – 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı ve 6 ml distile suda çözüldü.

5. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (167 U/L Xanthine oksidaz)

Orijinal ambalajından (1 ml'sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden enzim) 34.79 µl alındı ve üzerine 2 ml soğuk 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi eklendi.

6. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (2 M (NH₄)₂SO₄)

0.7928 g (NH₄)₂SO₄ alındı ve 3 ml distile suda çözüldü. (bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve soğuk olarak kullanıldı).

7. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.8 mM CuCl₂)

0.0108 g CuCl₂ alındı ve 100 ml distile suda çözüldü.

8. GSH Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.4, Tris - HCl Tamponu)

1.514 g Tris-HCl alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

9. GSH ölçüm tamponu (200 mM pH 8.2, 0.2 mM EDTA içeren Tris-HCl Tamponu)

6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml saf suda çözüldü ve pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

10. GSH miktarını ölçmek için gereken çözelti (10 mM DTNB):

0.03963 g DTNB alındı ve 10 ml'ye metanol ile tamamlandı.

11. LPO homojenatı tamponu (% 10 KCl):

10 g KCl alınarak 100 ml saf suda çözüldü.

12. LPO ölçüm karışımı

A - % 8 Sodyum lauril sülfat (SLS): 0.8 gr SLS alınıp distile su ile 10 ml'de çözüldü.

B - % 0.08 Tiyobarbütirik (TBA): 0.48 gr TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH ilavesi ile hacmi 60 ml'ye tamamlandı.

C - % 20 Asetik asit: 13 ml glasiyel asetik asit alındı üzerine 65 ml distile su eklendi.

3.4. Deney Bitkileri

Maclura pomifera (Yalancı Portakal) Ankara Üniversitesi kampüs alanından Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU ve Dr. Murat KOÇ tarafından 15.10.2010 yılında toplandı. Örnekler yine aynı araştırmacılar tarafından incelenip uluslararası teşhis yöntemleri kullanılarak türün teşhisi doğrulanmıştır. Örnekler M.Koç 1292 kodu verilerek Bozok Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (Yozgat) saklanmıştır.

3.5. Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Ankara yöresinden toplanan Maclura pomifera (Yalancı Portakal) meyveleri yıkandıktan sonra kabuğu soyuldu. Dilimlere ayrılarak 100 gr'lık porsiyonlar halinde süzgeç kâğıdına sarıldı. 250 ml distile su ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde bir gün ekstrakte edildi. Liyofilizatörde suyu uzaklaştırılarak ham meyve suyu ekstresi (MPSE) elde edildi.

3.6. Deney Hayvanları

Çalışmamızda 190-210g ağırlıktaki Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Akut inflamasyon deneyleri ve biyokimyasal analizler için toplam 30 adet kullanılmıştır. Deney hayvanları (Şekil 3.1), Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarından temin edildi. Tez kapsamındaki biyokimyasal analizler Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD Laboratuvarlarında yapıldı. Ratlar, deneye alınmadan önce gruplara ayrıldı ve standart bakım şartları altında muhafaza edildi.^{144, 145}



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan ratları gösteren fotoğraf.

3.7. Karragenin Kullanılarak Akut İnflamasyon Oluşturulması

Çalışmada MPSE'nin 500 ve 1000 mg dozlarının ve referans ilacın (indometazin) 25 mg/kg'lık dozlarının anti-inflamatuvar etkileri karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe ödemi modelinde araştırıldı¹⁴⁶. Hayvan gruplarına 500 ve 1000 mg/kg'lık dozlarda MPSE sonda ile oral yoldan uygulandı. Ekstrenin anti-inflamatuvar etkisi 25 mg/kg'lık dozlarda uygulanan indometazinin anti-inflammatuar etkisi ile karşılaştırıldı. Kontrol grubuna ise aynı hacimde çözücü olarak distile su verildi. Karragenin enjekte edilmeden önce hayvanların ayak hacimleri diz eklemine kadar plethismometrede ölçüldü. İlaçlar verildikten bir saat sonra bütün sıçanların ayak pençesine 0.1 ml % 1'lik karragenin enjekte edildi. Karrageninin oluşturduğu inflamasyonlu pençe hacim artışı (pençe ödemi), her saat başı ölçüldü. Son ölçüm yapıldıktan hemen sonra Tiyopental sodyum ile derin anestezi altında tüm gruplar servikal dislokasyon yöntemiyle dekapite edilerek sağ pençeleri diz ekleminden kesilip petri kaplarına konuldu, etiketlendi ve örnekler derin dondurucuda (-20 °C'de) saklandı.

Ekstraktların anti-inflamatuvar etkileri kontrol grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak tespit edildi.

3.8. Biyokimyasal Ölçümler

Anti-inflamatuvar etkilerin mekanizmalarını belirlemek amacı ile akut inflamasyon deneyleri sonrası rat pençelerinde bazı biyokimyasal incelemeler yapıldı. Rat pençeleri plathismometrik ölçümlerden hemen sonra biyokimyasal incelemeler için -20 °C’de saklandı. Pençe dokularının enzim aktiviteleri ölçülmeden önce pençelerin tırnakları hassas bir şekilde pençeden ayrıldı ve pençe homojenatları hazırlanarak üç gün içerisinde analizler yapıldı. Pençe homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda CAT, SOD enzim aktiviteleri ve GSH ile LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında ve üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

3.8.1. Biyokimyasal Analizler İçin Pençe Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Pençe dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra petri içerisinde -20 °C’de saklandı . Her bir çalışma için belirli miktarda tartılarak üzerine 2.5 ml tampon çözeltiler (her parametre için literatüre bağlı olarak, farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edildi ve sonrada bir ultra-turraks homojenizatörde 2 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4 °C’de santrifüj edildi ve üstte kalan berrak kısımda (süpernatant) enzim aktiviteleri tayin edildi^{147, 148}.

3.8.2. CAT Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm prensibi: Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂’in CAT vasıtasıyla H₂O’ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm’de ölçülmesi

esasına dayanmaktadır. Harcanan H_2O_2 miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yönteme göre hesaplanmıştır.

CAT ölçümü

CAT aktivitesi, Aebi (1984) 'nin metoduna göre ölçüldü¹⁴⁴. 0,5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi³²⁶. Homojenatlar, 18000 g'de 60 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar CAT aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H_2O_2 çözeltisinden 1.5 ml konularak numune çözeltisinden 1.5 ml ilave edilir edilmez kronometre çalıştırıldı. Alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması, 15 saniye aralıklarla 3 dakika süreyle, köre karşı kaydedildi.

Katalaz (CAT) aktivitesi'nin hesaplanması

Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 0.00394 ($mmol^{-1} \times mm^{-1}$) alınarak $A = \epsilon.b.c$ formülünden

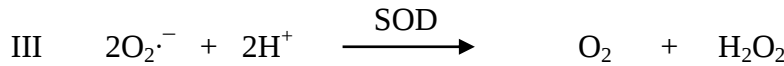
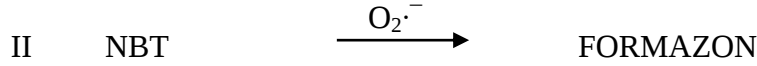
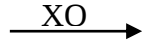
240 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2 'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı.¹⁴⁹ Formül pratik olarak $mmol/min = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak mmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Deneyler 3 tekrar olarak yapıldı.

3.8.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

Ölçüm prensibi : Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitro blue

tetrazolium) mevcutsa, NBT ile reaksiyona girerek formazon boyası oluştururlar. Bu bileşik 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Şayet ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2 'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalacak buna bağlı olarak da 560 nm'de ölçülen absorbans azalacaktır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesini verecektir.

Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir.



SOD ölçümü

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yöntemle ölçüldü.¹⁵⁰ Pençeler homojenize edildikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi.¹⁴⁷ Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0.3 mM Xanthine, 0.6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0.4 M Na_2CO_3 , 1.2 g/L BSA), 500 µl supernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyon bırakıldı ve 1000 µl $CuCl_2$ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

SOD aktivitesi'nin hesaplanması

Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi, mmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.

$$EU/mg.doku = 100 - \left(1 - \frac{\Delta A_{Kör} - \Delta A_{numune}}{\Delta A_{Kör}} \right) \times 100$$

3.8.4. Total GSH Miktarı Ölçümü

Ölçüm Prensipleri

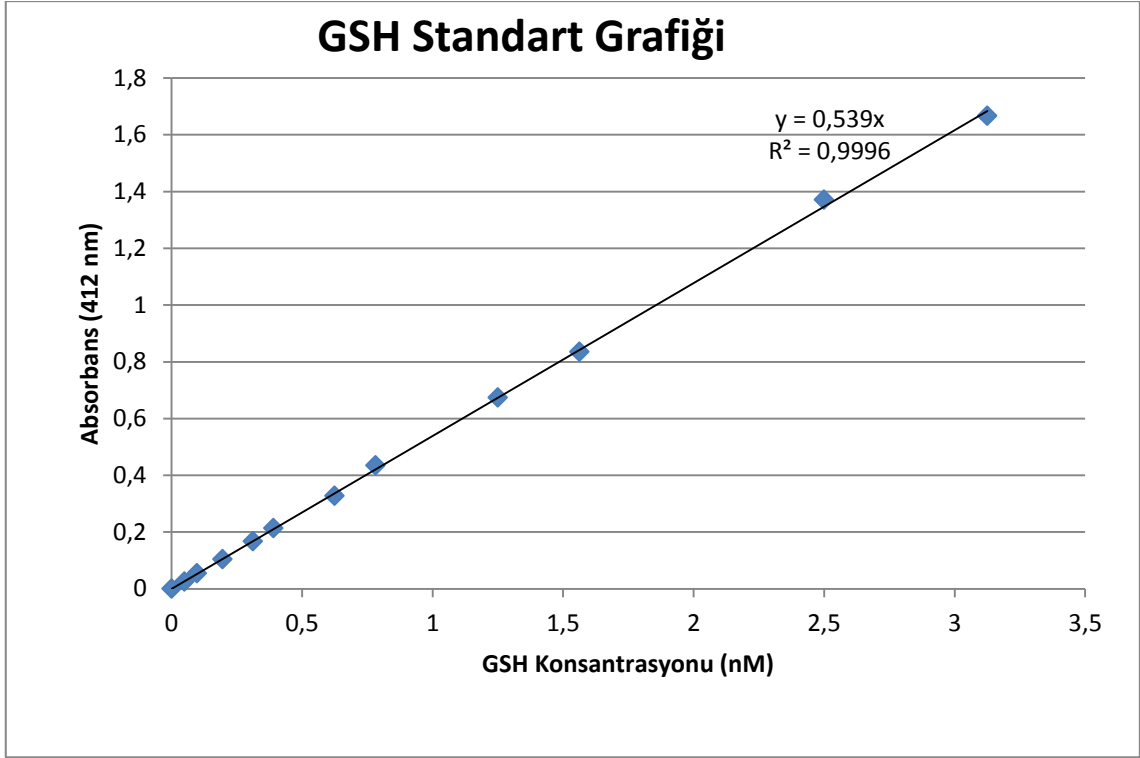
Ölçüm ortamındaki DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

GSH miktarının ölçülmesi

Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi.¹⁵¹ 0,5g doku üzerine 4.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi.¹⁴⁷ Homojenatlar, 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (0.2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH = 8.2), 500 µl süpernatant, 100 µl DTNB ve 7900 µl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37°C'ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra ölçümleri alındı.

GSH Miktarının Hesaplanması

Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten (Şekil 3.2) yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.



Şekil 3.2. GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.8.5. LPO miktarı ölçümü

Ölçüm Prensibi

Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır¹³³. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile stabil kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girer. LPO ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik (TBA) asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.¹⁵²

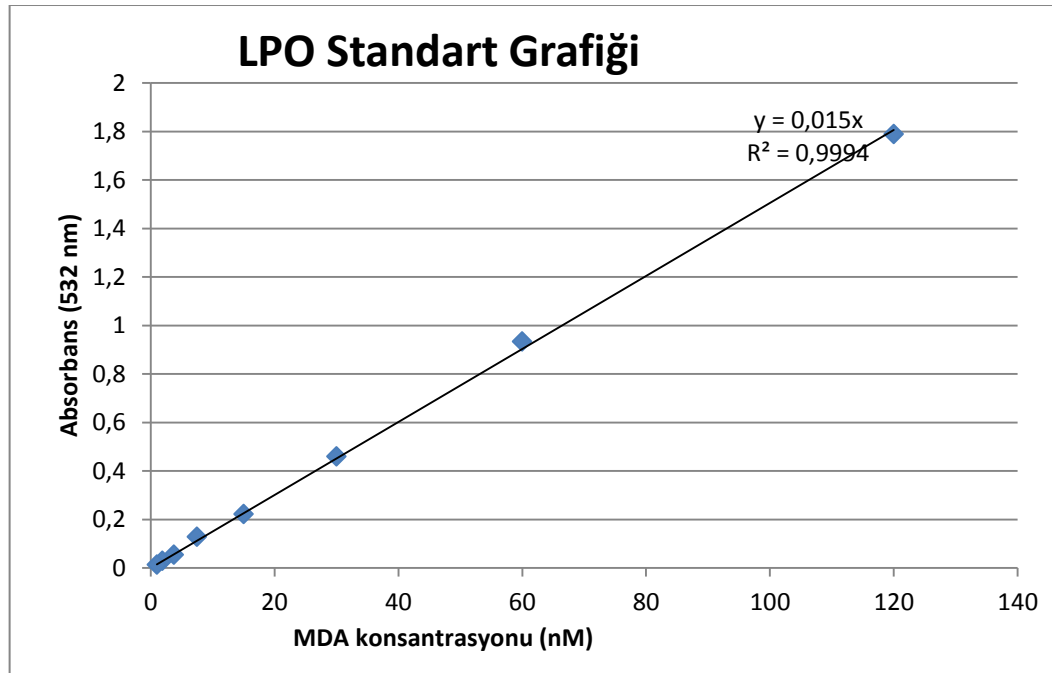
LPO Ölçümü

Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi.¹⁵² 0,5g doku üzerine 4.5 ml % 10 KCl ilave edilerek homojenize edildi.¹⁴⁷ Homojenatlar,

5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodium dodesil sulphate (SLS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl saf su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100 °C'ta 60 dakika inkubasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2.5 ml *n*-bütanol ilave edildi ve ölçüm alındı.

LPO Miktarının Hesaplanması

Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik cam küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı (Şekil 3.3). Numunelerin LPO miktarları, nmol MDA/gr doku olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.



Şekil 3.3. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 20.0 software programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analiz (ANOVA) testi ile belirlendi ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı.¹⁵³

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

4.1.1. Karragenin (CAR) ile Deneyisel Olarak Oluşturulan Pençe Ödemleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE) ve Referans İlaç Olarak Kullanılan İndometazin (IND)'in Etkileri

Çalışmada MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozlarının ve indometazin'in 25 mg/kg'lık dozunun anti-inflamatuvar etkileri karrageninle oluşturulan inflamasyonlu pençe ödeminde etkileri araştırıldı.¹⁵⁴ MPSE' in 500, 1000 mg/kg'lık dozlardaki anti-inflamatuvar etkileri kontrol grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak tespit edildi. Pençe ödeminin en yüksek seviyede olduğu 4. saatteki (Şekil 4.1) sonuçlar ve saatlere bağlı olarak elde edilen ölçüm sonuçlarının istatistik analizi Şekil 4.2'de sunuldu.

Maclura pomifera meyve suyunun 500 ve 1000 mg /kg dozdaki su ekstraktları karragenin ile uyarılan pence ödemi üzerine önemli oranda etkili olduğu görülmektedir. Kontrol (CAR) grubunda inflamasyonlu pence hacmi sağlıklı gruba nazaran 0.998 ml artış gösterdi. MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozlarında bu artış sırası ile 0.645, 0.568 ml'ye geriledi. IND'nin ise pençe hacimleri 4. saatte 0.447 ml olarak ölçüldü. Şekil 4.2'den görüldüğü üzere MPSE'nin 1000 mg/kg'lık dozunun IND'ye yakın oranda anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu belirlendi.



Kontrol (CAR)



İndometazin (referans)

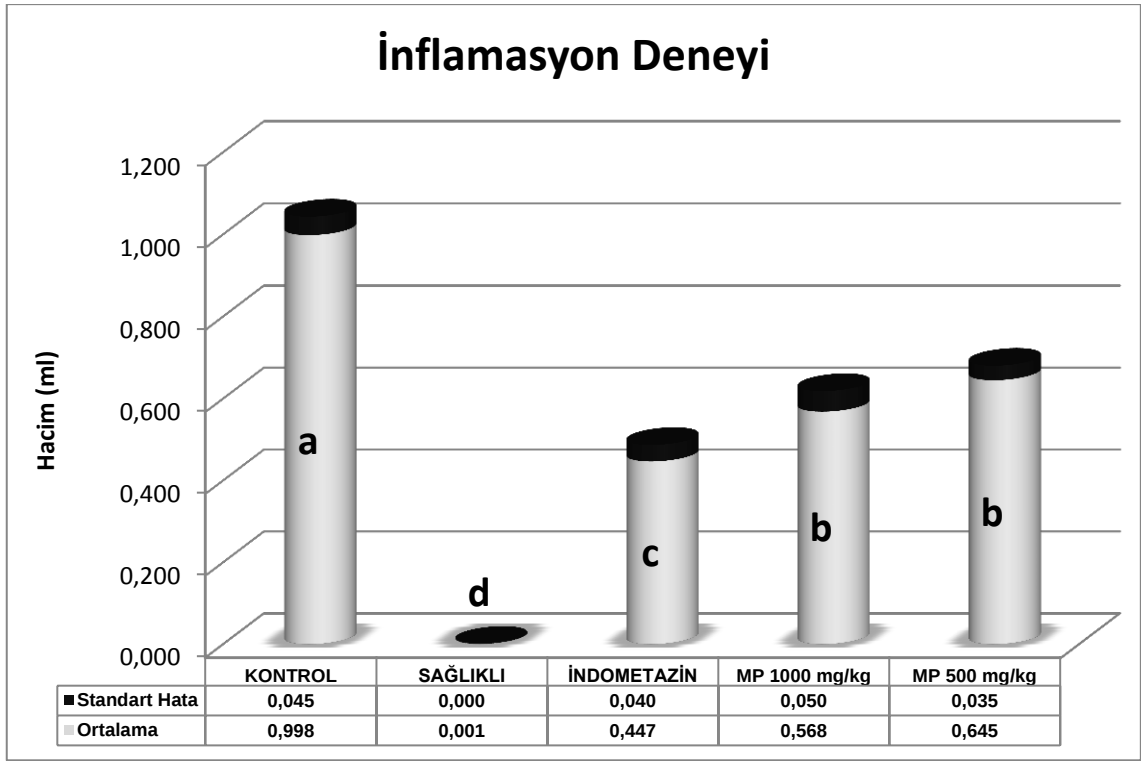


Sağlıklı



Maclura pomiferaomifera su ekstresi (MPSE)

Şekil 4.1. Maclura pomifera meyve suyunun 1000 mg /kg dozdaki su ekstraterinin karragenin ile uyarılan pençe ödemi üzerine etkisinin sağlıklı ve referans ilaç uygulanan grupların görünümü



Şekil 4.2. Maclura pomifera meyve suyunun 500 ve 1000 mg /kg dozdaki su ekstrelerinin karragenin ile uyarılan pence ödemi üzerine etkisi.

$P < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, aynı harflere sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ($P > 0.05$).

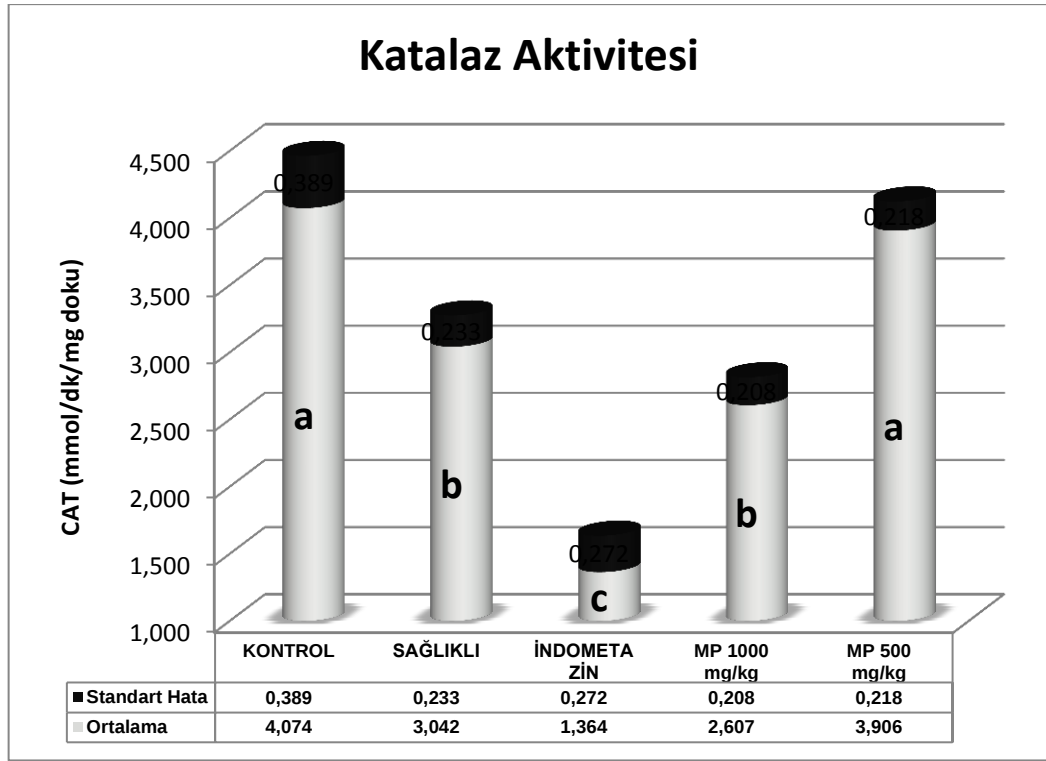
4.2. Biyokimyasal Bulgular

Karragenin deneyi ile anti-inflamatuvar etkisi olduğu tespit edilen rat pençelerinde bazı biyokimyasal incelemeler yapıldı. Rat pençeleri plathismometrik ölçümlerden hemen sonra biyokimyasal incelemeler için -20°C 'de saklandı. Pençelerin enzim aktiviteleri ölçülmeden önce pençelerin tırnakları hassas bir şekilde pençeden ayrıldı ve sıvı azot ile muamele edilip havanda parçalandı. Uygun tamponlarda pençe homojenatları hazırlandı. Pençe homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda CAT, SOD enzim aktiviteleri ve GSH ile LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında üç tekrar olarak yapıldı .

4.2.1. Rat Pençelerindeki Katalaz (CAT) Enzim Aktiviteleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE)'nin, İndometazin (IND)' in Etkileri

Çalışmada MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozlarının ve indometazin'in 25 mg/kg'lık dozunun CAT aktivitesi üzerine etkilerini gösteren sonuçlar Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü üzere CAT aktiviteleri sağlıklı hayvan grubunda 3.042 ± 0.233 , CAR grubunda 4.074 ± 0.389 , İND grubunda 1.364 ± 0.272 ve CAR ile birlikte uygulanan MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 3.906 ± 0.218 , 2.607 ± 0.208 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre CAR'ın önemli oranda ($P < 0.05$) artırdığı CAT aktivitesini, CAR ile birlikte uygulanan İND'nin çok önemli oranda azalttığı ($p < 0.05$) tespit edildi. İND' in aksine CAR ile birlikte uygulanan MPSE'nin 1000 mg/kg'lık dozu CAT aktivitesini sağlıklı grubu ile mukayase edildiğinde daha da azalttığı belirlendi ($p < 0.05$).

MPSE'nin iki dozu da CAT aktivitesini artırmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular İND'nin rat pençelerinde CAT aktivitesi üzerine bir inhibisyon etkisine sahip olduğunu fakat MPSE'nin 1000 mg/kg'lık dozda sağlıklı gruba yakın etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Sekil 4.3. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde *Maclura pomifera*'nın su ekstrelerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

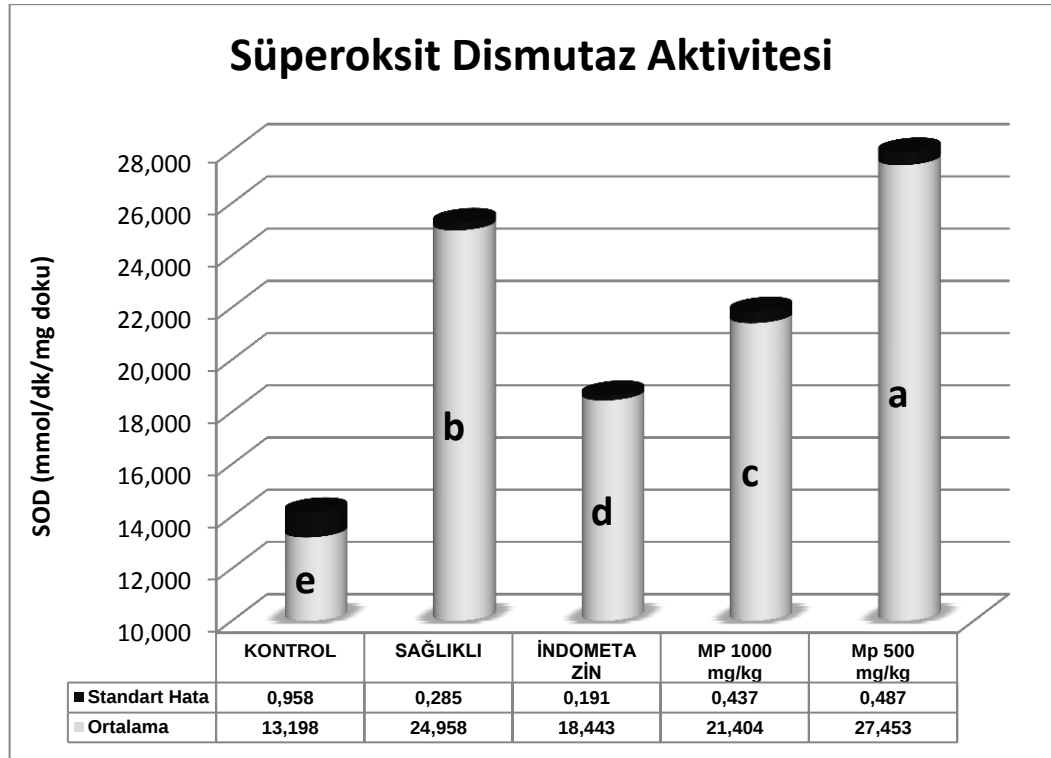
P<0.05 seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, aynı harflere sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır (P>0.05).

4.2.2. Rat pençelerindeki süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri üzerine *Maclura pomifera*'dan elde edilen su ekstresinin (MPSE)'nin, indometazin (IND) etkileri

MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozları ile indometazinin 25 mg/kg'lık dozu rat pençe dokularında belirlenen SOD aktiviteleri üzerine etkilerini gösteren sonuçlar. Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Şekil 4.4'den görüldüğü üzere SOD aktiviteleri sağlıklı grupta 24.958 ± 0.285 , CAR grubunda 13.198 ± 0.958 , IND grubunda 18.443 ± 0.191 ve CAR ile birlikte uygulanan MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 27.453 ± 0.487 , 21.404 ± 0.437 olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.4'de görüleceği gibi CAR'ın önemli oranda ($p < 0.05$) azalttığı SOD aktivitesini, IND grubunun SAĞLIKLI grubu kadar olmasada artırdığı tespit edilmiştir. CAR ile birlikte

uygulanan MPSE'nin iki dozunda da önemli ($p<0.05$) düzeyde SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir.

Şekil 4.3'den çok net bir şekilde görülebileceği üzere sağlıklı gruba göre CAR ile muamele sonrası meydana gelen SOD aktivitesinde ki inhibisyon ($p<0.05$) uygulanan MPSE (500 mg/kg) tarafından kuvvetli bir şekilde yeniden sağlıklı grubunun da üzerine yükseltilmiştir ($p<0.05$). Bu bulgular MPSE'nin SOD aktivitesi üzerine aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



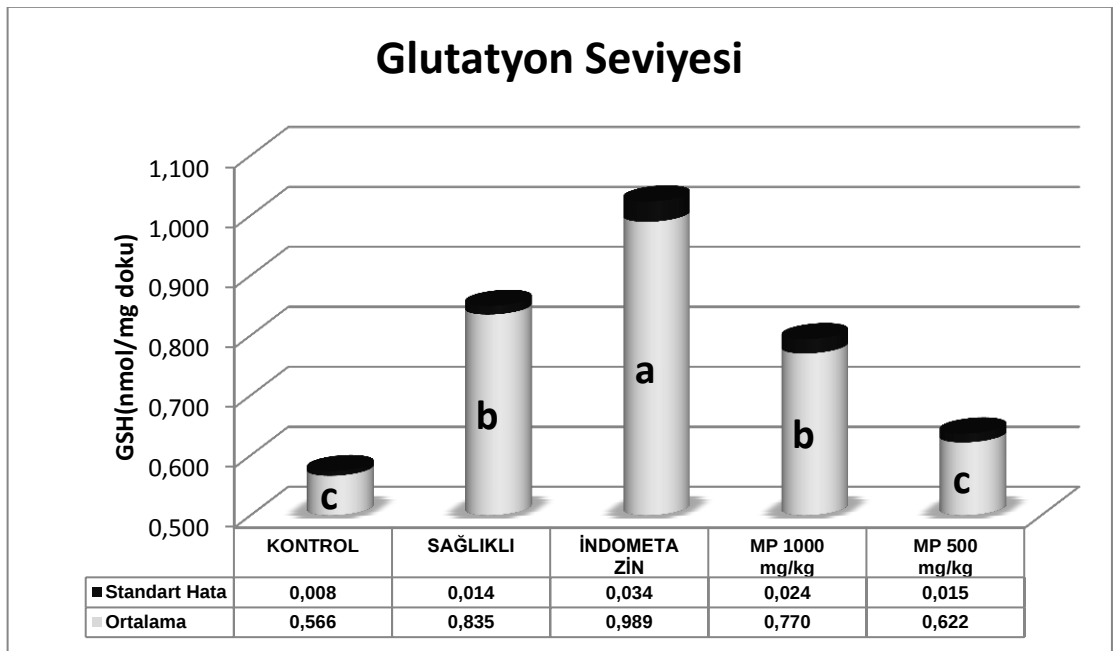
Şekil 4.4. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstrelerinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

$P<0.05$ seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, aynı harflere sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farksızdır ($P>0.05$).

4.2.3. Rat Pençelerindeki Glutasyon (GSH) Seviyeleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE), İndometazin (IND) 'nın Etkileri

MPSE'nin 500, 1000, mg/kg'lık dozlarının ve indometazin'in 25 mg/kg'lık dozlarının rat pençe dokularında belirlenen GSH miktarlarını gösteren sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Şekil 4.5'den görüldüğü üzere GSH miktarları sağlıklı grupta 0.835 ± 0.014 , CAR grubunda 0.566 ± 0.008 , IND grubunda 0.989 ± 0.034 ve MPSE'nin 500, 1000, mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 0.622 ± 0.015 , 0.770 ± 0.024 olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.5'den de çok net bir şekilde görülebileceği üzere kontrol grubuna göre CAR ile muamele sonrası meydana gelen GSH miktarındaki azalma ($p < 0.05$) CAR ile birlikte uygulanan 500 ve 1000 mg/kg MPSE ile IND tarafından yeniden artırmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular, IND ve MPSE'nin CAR ile birlikte uygulandıklarında GSH miktarını artırdığını göstermektedir.



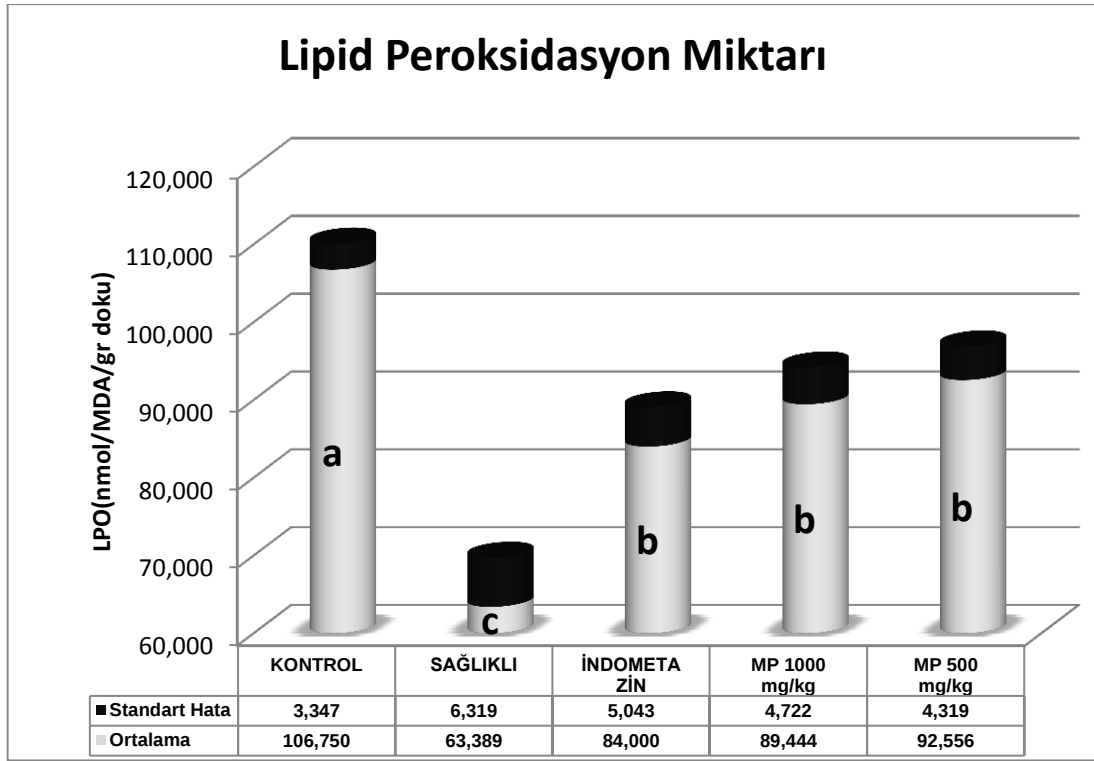
Şekil 4.5. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstraktlarının Glutasyon seviyeleri üzerine etkisi.

$P < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, aynı harflere sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır ($P > 0.05$).

4.2.4. Rat Pençelerindeki Lipit Peroksidasyon (LPO) Seviyeleri Üzerine Maclura Pomifera'dan Elde Edilen Su Ekstresinin (MPSE)'nin, İndometazin (IND) Etkileri

MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozlarının ve indometazin'in 25 mg/kg'lık dozlarının rat pençe dokularında belirlenen MDA miktarlarını gösteren sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.6'dan görüldüğü üzere LPO'nun göstergesi olan MDA miktarları sağlıklı grupta 63.389 ± 6.319 , CAR grubunda 106.750 ± 3.347 , IND grubunda 84.000 ± 5.043 ve CAR ile birlikte uygulanan MPSE'nin 500, 1000, mg/kg dozları ile muamele edilen gruplarda ise sırası ile 92.556 ± 4.319 , 89.444 ± 4.772 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize CAR'ın önemli oranda ($p < 0.05$) artırdığı LPO miktarını, CAR ile birlikte uygulanan IND ve MPSE dozları tarafından güçlü bir şekilde azaltıldığını ($p < 0.05$) göstermektedir.

Şekil 4.6'dan da çok net bir şekilde görülebileceği üzere kontrol grubuna göre CAR ile muamele sonrası meydana gelen LPO miktarındaki artış ($p < 0.05$) CAR ile birlikte uygulanan IND ve MPSE dozları tarafından net bir şekilde azaltılmış ve sağlıklı grup seviyesine yaklaştırılmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular CAR ile oluşturulan akut inflamasyonda lipid peroksidasyonunun arttığını ve IND ve MPSE'nin CAR ile birlikte uygulandıklarında LPO miktarını yeniden azalttığını göstermektedir. Referans ilaç (IND) ile MPSE' si grupları LPO miktarındaki azalma yönünden farksızdır ($p > 0.05$).



Şekil 4.6. Karragenin ile uyarılmış inflamasyon modelinde Maclura pomifera'nın su ekstrelerinin Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı üzerine etkisi

P<0.05 seviyesindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, aynı harflere sahip olan değerler Duncan testine göre istatistiksel açıdan farklıdır (P>0.05).

5. TARTIŞMA

Günlük hayatta en yaygın kullanılan ilaçlar arasında ağrı kesici ilaçlar ilk sırada yer almaktadır. Bu ilaçlar inflamasyonu önlemeye çalışırken gastrointestinal sistem üzerinde maalesef başka bir inflamasyon türü olan ülser gibi istenmeyen etkilere sahiptirler. Bu istenmeyen etkileri en aza indirebilmek için çevremizde yaygın olarak görülen bazı bitkilerin antiinflamatuvar ve antiülser etkilerinin araştırılması gelecekte bu alanda çok önemli bir çıkış açacağı düşünülmektedir. Bazı bitki türlerinin organik yapıda olmaları ve genel toksikolojik özelliklerinin nispeten zararsız veya az görülmesi insanlar için büyük bir avantajdır.^{1, 2, 9, 11, 37, 155, 156} Araştırılan bitkilerin etki mekanizması tam olarak açıklanamasa bile bu hastalığa etkinliğinden dolayı rutinde kullandığımız birçok ilacın yerine geçebilecek veya o ilaçlar ile beraber kullanıldığında o ilaçların etkinliğini artırabilecek potansiyele sahiptirler. Bitkisel ilaç ve tedavi yöntemlerinin popülerleşmeye başladığı bu dönemde kullandığımız bitkilerin, belki de her gün besinlere katılarak yenmesi rutin hale gelebilecektir.^{1, 2, 9, 11, 157, 158}

Bu bitkilerden birisi süs bitkisi olarak yetiştirilen *Maclura pomifera* (Yalancı portakal)'dır. Bu bitkinin halk ilacı olarak dünyanın bazı bölgelerinde kullanıldığı ve kimyasal bileşenlerinin neler olduğu literatüre geçmiştir.^{23, 159}

Mevcut çalışmada ise, halk hekimliğinde kullanımı ile ilgili bilgi sahibi olduğumuz fakat ülkemizde geniş yayılım gösteren *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid. – Yalancı Portakal türü deney materyali olarak seçilmiş ve bu türün biyolojik aktivitesi ile ilgili ilk verilerin dünya literatürlerinde yer alması sağlanmıştır. Bu amaçla, MPSE'nin 500, 1000 mg/kg'lık dozlarının anti-inflamatuvar etkileri karrageninle akut inflamasyon modeli kullanılarak araştırıldı.^{23, 146, 160} Ekstrenin anti-inflamatuvar etkisi ticari anti-inflamatuvar indometazinin (mg/kg'lık dozları) antiinflamatuvar etkileri ile mukayese edildi.^{9, 23, 159}

CAR ile oluşturulan akut enflamasyon modeli üzerinde yapılan çalışmalarımızda MPSE'nin her iki dozunun da anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Bu anti-inflamatuvar etkinin istatistiksel olarak 500, 1000 mg/kg dozda önemli ($p<0.05$) olduğu ve Şekil 4.2'den görüldüğü üzere MPSE'nin 1000 mg/kg'lık dozunun IND'ye yakın oranda anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu tespit edildi. MPSE'nin anti-inflatuvar etkisi doza bağlı olarak artmıştır.

Bu araştırma MPSE'nin anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve bu etki değerlendirildiği takdirde bu ekstreden izole edilebilecek saf molekül veya moleküllerin yeni anti-inflamatuvar ilaç veya ilaçlar olabileceğini göstermektedir. Maclura pomifera ve benzer bitkilere ait anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma literatüre kaydedilmiştir.^{156, 160-162}

Karrageninle indüklenen inflamasyon reaksiyonu iki fazdan oluşur. Bunlar: Erken (enjeksiyon sonrası başlar ve bir saat sürer) ve geç faz (1 saat sonra başlar ve 3 saat sürer) olarak isimlendirilir.^{37, 163} Erken fazın histamin, serotonin ve bradikinin salınımına bağlı olduğu, geç fazın ise genellikle PG oluşumuna bağlı olarak geliştiği tespit edilmiştir.¹⁶⁴ Şekil 4.2'de MPSE'nin IND'nin anti-enflamatuvar etkisi CAR enjeksiyonunun dördüncü saatinde doruk noktaya ulaştığı nokta olarak kabul edilmiş ve bu ölçümler değerlendirilmiştir. Bu süre yukarıda belirtildiği gibi karragenin inflamasyonunun geç dönemi olarak kabul edilmektedir.

İnflamasyon; basit bir izahı yapılacak olursa, bölgesel lökosit göçü şeklinde tanımlanabilir. Böyle olsa bile aslında farklı uyaranların ki bunlar endojen yada eksojen olabilir; vasküler dokularda oluşturduğu karmaşık ve kombine savunma mekanizmasıdır.^{61,165} İnflamasyon organizmada enfeksiyöz, fiziksel, kimyasal ve diğer etkenlerin neden olduğu doku hasarına karşı sellüler ve hüморal düzeyde oluşan güçlü ve abartılmış bir fizyolojik cevaptır.^{60, 168}

İnflamasyon ilk kez M.S. I. yüzyılda yaşamış olan Celsus tarafından, ciltte kızarma, sıcaklık artışı, ağrı ve şişme ile tanımlanmış olup; sonraları fonksiyon kaybı da bu defektlere eklenmiştir.^{38, 39} Böyle bir reaktif cevabın amacı, injüriye sebep olan etkeni ve ortaya çıkan ürünleri ortadan kaldırmak ve zararlı enfeksiyon bölgesinde tutarak kontrol sağladıktan sonra, hasarlı dokunun tamir ve yenilenmesini mümkün kılmaktır.^{60, 168}

İnflamasyonlarla ilgili çok sayıda sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmalar içinde kabul gören inflamatuvar sürecin süresine dayalı yapılan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre inflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır.^{37,45} Akut inflamasyon kısa süresi kısadır, birkaç dakika ya da birkaç gün sürebilir. Akut inflamasyon eksudasyon (vasküler) ve lökosit akümüülasyonu (hücrel) ile karakterizedir.^{15, 165}

Karragenin ödeminin oluşmasında COX ve Lipooksijenaz enzimlerinin de önemli rol oynadığı artık iyi bilinmektedir.^{17, 166} Karragenine bağlı ödemde artmış damar permeabilitesinin düzenlenmesinde nitrik oksidinde görev aldığını düşündüren bulgulara ulaşılmıştır.¹⁶⁷

Karragenin inflamasyonunun erken fazında bradikinin üretiminin artması, L ve T tipi kalsiyum kanallarının aktivasyonuna ve de hücre içi kalsiyum düzeyinin artmasına yol açar.^{155, 168} Vajja BNL ve arkadaşları karragenin inflamasyonunda hücre içi kalsiyum düzeyinin yükselmesine bağlı olarak IL-1 β salgısının arttığını göstermişlerdir.¹⁶⁹

Karragenin inflamasyonunun geç fazında nötrofil infiltrasyonun yanı sıra hidrojen peroksit, superoksit (O₂⁻) ve hidroksil radikalleri gibi oksijen kaynaklı serbest radikallerin de önemli rol oynadığı belirlenmiştir.¹⁷⁰

İnflamasyonun oluşmasında histamin, serotonin, bradikinin, nitrik oksit, lipooksijenaz ürünleri, sitokinler, serbest oksijen radikalleri, lizozomal enzimler ve PG'ler gibi inflamasyon mediyatörlerinin rolü bilinmektedir.¹⁷¹⁻¹⁷³ Bu inflamasyon mediyatörlerinin, karragenine bağlı inflamatuvar reaksiyonun oluşmasında işlevleri olduğu ispatlanmıştır.^{17, 69, 146}

İnflamasyonda rol oynayan önemli etkenlerden birinin de serbest radikaller olduğu bilinmektedir. Bu düşünce mevcut tez kapsamında yapılan çalışmalarda da öncelikli amacımızı oluşturmuştur. Bu amaçla, inflamasyon prosesinde serbest radikallerin rollerinin hangi düzeyde etkili olduğunu belirlemek için tüm rat pençelerinde bazı biyokimyasal antioksidan parametreler araştırılmıştır. Dokularda çalışılan bu antioksidan parametreler: SOD, CAT, GSH ve LPO' dur.

Mevcut çalışma sonuçları CAR ile oluşturulmuş inflamasyonlu sıçan pençelerinde serbest oksijen radikallerinden kaynaklanan LPO düzeyinin arttığını göstermektedir (Şekil 4.7). Bu sonuç akut enflamasyonda serbest oksijen radikallerinin de önemli rol oynadığını göstermektedir. CAR enjeksiyonu ile oluşturulan pençe ödemli dokularda LPO miktarının arttığı literatürde kayıtlıdır.^{23, 160, 164, 174, 175}

LPO oksidatif stresin önemli bir indikatörü olup, artışı hem doku hasarının hem de o dokudaki serbest oksijen türlerinin artması anlamına gelmektedir. Serbest radikallerin hücre membranlarına saldırımlarına bağlı olarak LPO miktarının arttığı belirtilmiştir.¹⁷⁶ LPO miktarının artması bütün organizmalar için oldukça zararlıdır. Çünkü LPO kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve bu oto katalitik reaksiyonu sonucu oluşan lipid peroksit, membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurken lipid, alkol ve aldehitler gibi istenmeyen yan ürünler oluşur.^{88,53,136} Bu ürünlerin ya hücre düzeyinde metabolize edilerek veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine

hasarı yayarak birçok hastalığa ve doku hasarına neden oldukları bilinmektedir.¹³⁶

Organizmalar ROS kaynaklı LPO ve daha ileri olan hasarları azaltmak zorundadır ve bu amaçla antioksidan savunma sistemlerine ihtiyaç duyarlar. Antioksidantların eksikliğinde veya yetersiz kaldığında hücrel hasarlarda kaçınılmaz olmaktadır. Antioksidan savunma sistemlerinden birincil olanlar antioksidan enzimlerdir. Bu antioksidan savunma sistemleri SOD, GPx CAT ve GSH'dir.

Çalışmamızda CAR ile inflamasyon oluşturulmuş rat pençelerinde bazı antioksidan enzim aktiviteleri düşük düzeyde bulunmuştur. Oksidatif hasara neden olan serbest oksijen türlerine karşı savunmada önemli süpürücü enzimlerden birisi SOD enzimidir. SOD 'ler (sitoplazmik Cu / Zn SOD, Mitokondrial Mn-SOD), süperoksit anyonunun H₂O₂'ye dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Bu enzimin inaktif olması dokularda süper oksit anyonunun birikimine bu ise oksidatif hasara neden olur.¹⁵⁷

Şekil 4.3'den de görüleceği gibi SOD aktivitesi CAR tarafından önemli oranda azaltılmıştır. CAR ile uyarılmış akut inflamasyonlu dokularda SOD enziminin deaktif olmasının sonucu olarak bu dokularda LPO düzeyi de yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4). CAR aksine, MPSE in tüm dozları ile IND tarafından inflamasyonun baskılandığı rat pençe dokularında SOD enzim aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4). MPSE nin tüm dozları ile IND tarafından inflamasyonun azaltıldığı rat pençe dokularında LPO miktarının azaltılması da SOD aktivitesindeki artışı destekleyen bir sonuçtur. Bu çalışmada MPSE' nin 500 mg/kg'lık dozunun 1000 mg/kg'lık dozdan ve sağlıklı grubun SOD enzim aktivitesi yönünden daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Dozun artmasına rağmen orantılı olarak SOD enzim aktivite miktarının artmaması bize MPSE nin uygun dozunun 500 mg/kg olduğunu göstermiştir.

CAT enzimi için (Şekil 4.3) CAR ile inflamasyon oluşturulmuş dokular da sağlıklı dokular ile mukayese edildiğinde CAT aktivitesi önemli oranda (p<0.05)

artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum IND 'nin verilmesi ile tersine çevrilmiştir. Yani CAT aktivitesi IND tarafında inhibe etmiştir. IND'nin aksine MPSE'nin tüm dozları CAT aktivitesini güçlü bir şekilde artırmıştır özellikle de MPSE'nin 500 mg/kg lık dozu sağlıklı grubun CAT enzim aktivitesi bakımından miktar olarak önemli oranda üzerine çıkmıştır ($p<0.05$) . Bu bulgular IND'nin rat pençelerinde CAT aktivitesi üzerine inhibisyon etkisine sahip olduğunu fakat MPSE'nin bütün dozlarında aktive edici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

CAR tarafından rat pençelerinde CAT aktivitesinin artırıldığı ve NSAID'ler tarafından azaltıldığına ilişkin çok sayıda özellikle çalışma ekibimizin önemli literatür kaydı mevcuttur.^{9,161, 175, 177} Bu bağlamda bulgularımız literatürlerle uyum içerisindedir. Diğer yandan MPSE'nin bütün dozları tarafından aktivitenin daha da artırılması özellikle 500 mg/kg'lık dozda sağlıklı gruptan daha yüksek CAT aktivitesi göstermesi ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Diğer bir önemli antioksidan savunma sitemi de GSH' dır. Bu sebeple tüm dokularda GSH miktarı da bu çalışmada ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Bu şekilden de görüleceği üzere CAR'ın çok önemli oranda azalttığı GSH miktarı, IND ve MPSE' nin 1000 mg/kg'lık dozu tarafından yeniden artırılmıştır ($p<0.05$). Fakat MPSE'nin 500 mg/kg' lık dozunda CAR grubuna göre önemli bir artış gözlenmemiştir($p>0.05$). Bu bulgular bize IND ve MPSE gibi tüm anti-inflamatuar ajanların dokularda antioksidan GSH miktarını artırdığını göstermektedir.

CAR'ın neden olduğu inflamasyon prosesinin en önemli nedenlerinden birisi oksidatif sistemin harekete geçirilip radikal oksijen türlerini düzeyinde bir artışın olduğu pek çok literatürde ortaya konulmuş,^{9, 169, 175, 178} ve inflamasyon prosesi esnasında antioksidant sistemin yetersiz kaldığı vurgulanmıştır.^{9, 175, 179, 180} Bu bağlamda

organizmada serbest radikallerin etkisizleştirilmesinde en önemli antioksidantlardan birisi olan glutatyonun önemli rol oynadığı kaydedilmiştir.^{9, 155, 160, 180}

GSH miktarının CAR tarafından azaltılması ile inflamasyon prosesinin ilerlemesi arasındaki doğrudan bağlantı IND gibi anti-inflamatuvar ilaçlarında bu prosesi engellemede GSH miktarını arttırmak rolleri ile ilişkilendirilmiştir.^{9, 155, 175, 178, 181, 182} Bizim bulgularımızda literatürdeki bulguları desteklemektedir. Bu sonuçlar ışığında MPSE'nin anti-enflamatuvar aktivitesinin GSH gibi antioksidan savunma sistemi üzerine pozitif etki göstermesi ile yakından alakalı olduğu düşüncesindeyiz.

Ekibimizin Maclura pomifera'nın ekstreleri üzerine yürüttüğü paralel bir diğer çalışmada Maclura pomifera'nın antiülser etkisi bulunmuş³ ve mevcut bulgular ile hem antiinflamatuvar etkili hem de gastrik hasarları önleyen yeni bir tedavi yöntemi bulduğumuzu düşünmekteyiz. Literatür ve bizim benzer çalışma sonuçlarına dayanarak MPSE'nin anti-inflamatuvar etkisi onun antioksidan özelliğini ile yakından ilişkilidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, enflamasyon sürecinde oksiadatif hasarın önemli rol oynadığını ve enflamasyonun azaltılmasında antioksidan sistemlerin önemli olduğunu söyleyebiliriz. Maclura pomifera ise hem antiinflamatuvar özellikleri ve hemde gastroprotektif yetenekleri sayesinde devrim niteliği taşıyan yeni bir araştırma sahası açacaktır.

Maclura pomifera ve benzer bitkilere ait anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma literatüre kaydedilmiştir. Maclura pomifera gibi çevremizde halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin tespit edilip kontrollü deneylerle biyokimyasal, patolojik, farmakolojik ve toksikolojik çalışmaları yapılmalıdır. Elde edilecek veriler bilim dünyasına kazandırılıp bitkisel ilaç niteliği ile hastalık tedavi sürecinde kullanılabilir.

Bazı bitki türlerinin organik yapıda olmaları ve genel toksikolojik özelliklerinin nispeten zararsız veya az görülmesi insanlar için büyük bir avantajdır. Bu bitkilerin etki mekanizması tam olarak açıklanamasa bile bu hastalığa etkinliğinden dolayı rutinde kullandığımız birçok ilacın yerine geçebilecek veya o ilaçlar ile beraber kullanıldığında o ilaçların etkinliğini artırabilecek potansiyele sahiptirler. Bitkisel ilaç ve tedavi yöntemlerinin popülerleşmeye başladığı bu dönemde kullandığımız bitkilerin, belki de bir baharat gibi besinlerimize katılması rutin hale gelebilecektir.

Bu tür çalışmalarda bitki ekstraktından saf madde elde ederek hem etki seviyesi artırılabilir hemde bu saf madde ilaç dünyasında insanlığın ihtiyaçlarına sunulabilir.

KAYNAKLAR

1. Laine L, Ahnen D, McClain C, Solcia E, Walsh J.H. Review article: potential gastrointestinal effects of long-term acid suppression with proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Therap*, 2000, 14: 651-668.
2. Halıcı M. Bazı Likenlerden İzole Edilen Maddelerin Sıçanlarda İndometazin İle Oluşturulan Ülser Modelinde Antiülserojen Mekanizmaların Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya ABD. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2008.
3. Aci R. Maclura pomifera bitkisinin su ekstresinin ratlarda indometazin ile oluşturulan ülser modeli üzerine etkilerinin araştırılması ve antioksidan mekanizmasının incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD. Yüksek Lisans tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.
4. Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y, Takahashi S, Oyamada H, Morita Y, Yoneta T, Kondo M. Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun*, 1989, 7: 285-291.
5. Hudson N, Hawthorne AB, Cole AT, Jones PD, Hawkey CJ. Mechanisms of gastric and duodenal damage and protection. *Hepatogastroenterology*, 1992 Feb, 39: 31-36.
6. Schaffer WM, Bronnikova TV. Peroxidase-ROS interactions. *Nonlinear Dynamics*, 2012, 68: 413-430.
7. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Linuma S, Ichikawa H, Yasuda M, Takahashi S, Kondo M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, 1993, 34: 732-737.

8. Suleyman H, Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Karagoz Y, Gocer F, Halıcı M, Bayir Y. Antiinflammatory and antiulcer effects of aqueous extract of *Lobaria pulmonaria*. *Phytomedicine*, 2003, 10 552-557.
9. Halıcı M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine*, 2005, 12: 656-662.
10. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halıcı M, Kazaz C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *Journal Ethnopharmacology*, 2006, 103: 59-65.
11. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halıcı M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 2006, 13: 584-590.
12. Ustaçelebi Ş. *İmmunoloji*. Baskı. İstanbul Güneş kitapevi, 1999: 119-325.
13. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Çeviri: Çevikbaş U, Basic Pathology*. Baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 26-46.
14. Guyton C, John E, Çeviri:Yıldırım G. *Hall Text Book of Medical Physiology*. Çeviri: Yıldırım G. Baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2001: 392-402.
15. Maslinsk D, Gajewski M. *Some aspects of inflammatory process*. Baskı. 1998: 199-204
16. Karadurmuş N. İnflamasyonda Nöroendokrin Sistem Aktivasyonu, Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Seminerleri, 2003, Ankara.
17. Gupta M, Mazumdar UK, Sivakumar T, Vamsi MLM, Karki SS, Sambathkumar R, Manikandan L. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Bryonia Laciniola* in experimental animal models. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 1342-1144.

18. al-Tuwaijri AS, Mustafa AA. Verapamil enhances the inhibitory effect of diclofenac on the chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes and carrageenan-induced rat's paw oedema. *International Journal Immunopharmacol*, 1992, 14: 83-91.
19. Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y, Oztasan N, Suleyman B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol Journal Pharmacol*, 2004, 56: 775-80.
20. Maling HM, Webster ME, Williams MA, Saul W, Anderson W, Jr. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48-80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. *Journal Pharmacol Exp Ther*, 1974, 191: 300-10.
21. Livingston A. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2000, 30: 773-81, vi.
22. Wolfrom M.L, Komitsky Jr.F, Fraenkel G, Looker J.H, Dickey E.E, McWain P, Thompson A, Mundell P.M, Windrath O.M. Macluraxanthone and two accompanying pigments from the root bark of the osage orange. *Tetrahedron Letters*, 1963, 4: 749–755.
23. Kupeli E, Orhan I, Toker G, Yesilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of Maclura pomifera (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin. *Journal of ethnopharmacology*, 2006, 107: 169-174.
24. Saloua F, Eddine NI, Hedi Z. Chemical composition and profile characteristics of Osage orange Maclura pomifera (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Industrial Crops And Products*, 2009, 29: 1-8.

25. Carlson G.G, Volney H.J. Somenotes on uses of plants by theComanche Indians.
Papers of the Michigan Academy of Science. Arts and Letters, 1940, 25: 517–542.
26. Bourdy G, Chavez de Michel LR, Roca-Coulthard A. Pharmacopoeia in a
shamanistic society: the Izoceno-Guarani (Bolivian Chaco). *Journal of
ethnopharmacology*, 2004, 91: 189-208.
27. Peterson C.F, Brockemeyer E.W. The antifungal activity of an aqueousextract of
osage orangewood. *Merican Journal of Pharmaceutical Sciences for Support
Public Health*, 1953, A 125: 303–310.
28. Jones J.M, Soderberg F. Cytotoxicity of lymphoid cells induced by Maclura
pomifera (MP) lectin. *Cellular immunology*, 1979, 42: 319–326.
29. Son IH, Chung IM, Lee SI, Yang HD, Moon HI. Pomiferin, histone deacetylase
inhibitor isolated from the fruits of Maclura pomifera. *Bioorganic & medicinal
chemistry letters*, 2007, 17: 4753-4755.
30. Tsao R, Yang R, Young J.C. Antioxidant isoflavones in osage orange, Maclura
pomifera (Raf.) Schneid. *Journal of Agriculture&Food Chemistry*, 2003, 51:
6445–6451.
31. Vesela D, Kubinova R, Muselik J, Zemlicka M, Suchy V. Antioxidative and
EROD activities of osajin and pomiferin. *Fitoterapia*, 2004, 75: 209–211.
32. USDA NRCS. The PLANTS Database <http://plants.usda.gov>. 15.07.2012
33. The Plant List (2010). Version 1; <http://www.theplantlist.org/>. 15.07.201234.
Rouge B. PLANTS (National Plants Database) <http://plants.usda.gov>.
15.07.2012
35. R W. TÜBİTAK Bilim ve Teknik
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/plantae/spermatophyta.htm>.
15.07.2012

36. Pehlivan E, Kahraman HT. Hexavalent chromium removal by Osage Orange. *Food Chemistry*, 2012, 133: 1478-1484.
37. Vesela D, Kubinova R, Muselik J, Zemlicka M, Suchy V. Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin. *Fitoterapia*, 2004, 75: 209-211.
38. Dunne MW. *Inflammation and repair*. Baskı. Philadelphia, Lippincott, 1990: 165-176.
39. Higgins AJ. The biology pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. *J Vet Pharmacol Therap*, 1985, 8: 1-18.
40. Rezende-Neto, Moore, Melo de Andrade. Systemic inflammatory response secondary to abdominal compartment syndrome: stage for multiple organ failure. *Journal Of Trauma-Injury Infection And Critical Care*, 2002, 53: 1121-1129.
41. Royson D, Fleming JS, Desai JB, et al. Increased production of peroxidation products associated with cardiac operations: Evidence for free radical generation. *J Thorac Cardiovasc Surgical And Radiologic Anatomy*, 1986, 91: 759.
42. Landman J, Olweny E, Sundaram C. Prospective comparison of the immunological and stress response following laparoscopic and open surgery for localized renal cell carcinoma. *Clinical Urology*, 2004, 171: 1456-1460.
43. Dunker M. S, Hove T, Bemelman W. A. Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Expression of Human Leukocyte Antigen-DR on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients After Laparoscopic Conventional Bowel Resection: A Randomized Study. *The American Society of Colon and Rectal Surgeons*, 2003, 46: 1238-1244.

44. Schneemilch C, Ittenson A, Ansorge S, Hachenberg T. Effect of 2 anesthetic techniques on the postoperative proinflammatory and anti-inflammatory cytokine response and cellular immune function to minor surgery. *Journal Clinic Anesthesia*, 2005, 17: 517-27.
45. Bullock BL. *Inflammation and repair*. Baskı. New York, Lippincott, 1996: 276-311.
46. Brattsand R, Thalen A, Roempke K, et al. Influence of 16 alfa 17 alfa-acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1999, 16: 779-786.
47. Malaya G. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Chloroform Extract of *Bryonia laciniosa* in Experimental Animal Models. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 1342-1344.
48. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the edema of inflammation. *Nature*, 1973, 246: 217-219.
49. Rao ST, Currie JL, Shaffer AF, Isakson C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J Pharm Exp Ther*, 1994, 269: 917-925.
50. Ogonowski AA, May SW, Moore AB, Barret LT, O'Bryant CL, Pollock SH. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. *J Pharm Exp Ther*, 1997, 280: 846-853.
51. Di Rosa M, Sorrentino L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Eur J pharmacol*, 1968, 4: 340-342.
52. Imhof BA, Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm Metab Res*, 1997, 29: 614-621.
53. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Inflammation*. 25 Baskı. 2000.

54. Onat T, Emerk K. *İnsan Biyokimyası*. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2002.
55. Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP. Inflammatory effects of prostaglandin D2 in rat and human skin. *Br J Pharmacol*, 1976, 56: 229-233.
56. Kayaalp SO. *Otokoidler içinde: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Baskı. Ankara, Hacettepe- Taş, 2000.
57. Maling HM, Webster ME, Williams MA, Saul W, Anderson W. Inflammation induced histamine, serotonin, bradikinin and compound 48/80 in the rat: Antagonist and mechanism of action. *J Pharm Exp Ther*, 1974, 191: 300-310.
58. Pamela C, Champe Richard A. *Biochemistry*. Çeviri: Dirican M. Baskı. İstanbul, Nobel tıp kitabevi Ltd Şti, 1997: 257-267.
59. Tuncer M. *Serotonin agonist ve antagonistleri*. Baskı. Ankara, Hacettepe Taş, 2002: 1396-1466.
60. Maleki N, NAYebi AM, GAjani A. Effects of central and peribheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema *International Immunopharmacol*, 2005, 5: 1723-30.
61. Arthur C.Guyton, John E Ç. *Hall Text Book of Medical Physiology*. Çeviri: G Y. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2001: 392-402.
62. Kılıçturgay K. *İmmunolojiye Giriş*. Baskı. İstanbul Güneş ve Nobel kitapevi, 1994: 95-101.
63. Co DO, Hogan LH, Il-Kim S, Sandor M. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. *Immunol Lett* 2004, 92: 135-142.
64. Mielke ME, Peters C, Hahn H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev*, 1997, 158: 79-93

65. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3228-3232.
66. Vane JR. The mode of action of aspirin and similar compounds. *J Allergy Clin Immunol*, 1976, 58: 691-712.
67. Sakurai K, Sawamura T. Stress and Vascular Responses: Endothelial Dysfunction via Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1: Close Relationships With Oxidative Stress. *J Pharmacol Sci*, 2003, 91: 82-86.
68. Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, Cate RL, Tizard R, Sinclair LK. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potent anti-inflammatory activity. *Nature*, 1986, 320: 77-81.
69. Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J*, 1987, 1: 89-96.
70. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand Rheumatol*, 1996, 25: 9-21.
71. Mitchell JA, Warner TD. Cyclooxygenase-2 Pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol*, 1999, 128: 1121-1132.
72. Ferreira SH. Peripheral analgesic sites of action of antiinflammatory drugs. *Int J Clin Pract Supp*, 2002, 128: 2-10.
73. Amadio P, Cummings DM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postgrad M*, 1993, 93: 73-97.
74. Kayaalp SO. *Non-steroidal antiinflatuvar ilaçlar*. Baskı. Ankara, Hacettepe-Taş, 1998: 1026-1061.

75. Flower RJ. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs: back to the future*. Baskı. oxford, 1999: 693-696.
76. Abramson SB, Weismann G. The mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum*, 1989, 32: 1-9.
77. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am j Med*, 1999, 106: 375-425.
78. Laudanno OM, Cesolari JA, J. E. Gastrointestinal damage induced by celecoxib and rofecoxib in rats. *Digestive Disorder Science*, 2001, 46: 779-784.
79. Karaaslan Y. Non-steroidal antiinflatuar ilaclar. *Ilac ve Tedavi Dergisi*, 1993, 6: 531-537.
80. Clyman RI, Hardy P, Waleh N, Chen YQ, Mauray F, Fouron JC, Chemtob S. Cyclooxygenase-2 plays a significant role in regulating the tone of the fetal lamb ductus arteriosus. *Am J Physiol*, 1999, 276: 913-921.
81. Brenner DE, Harvey HA, Lipton A, Demers L. A study of prostaglandin E2, parathormone, and response to indomethacin in patients with hypercalcemia of malignancy. *Cancer Nursing*, 1982, 49: 556-561.
82. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*, 1991, 325: 1593-1596.
83. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*, 1999, 53: 169-180.
84. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995, 41: 1819-1828.
85. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1984, 1: 1396-1397.

86. Smith C, Marks AD. *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası*. Çeviri: İnal Erden M, Atik U, Aksoy N, A H. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2007: 439-458.
87. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. *AKÜ*, Afyon 2000: 1-35.
88. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 1984, 219: 1-14.
89. Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest*, 1982, 47: 5-18.
90. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal. Neonatal Med*, 2007, 1-9.
91. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoat K, Xin W. Nutritional aspects of free radicals. *Pro Nutr Soc*, 1987, 46: 1-12.
92. Akkuç I. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Baskı. Konya, Mimoza Yayinlari, 1995.
93. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad Biol Med* 1985, 1: 3-25.
94. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol*, 1987, 127: 21-8.
95. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol Biotechnol*, 2007, 37: 2-4.
96. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 1999, 8: 53-63.

97. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 7915-7922.
98. Robison TW, Murphy JK, Beyer LL, Richters A, Forman HJ. Depression of stimulated arachidonate metabolism and superoxide production in rat alveolar macrophages following in vivo exposure to 0.5 ppm NO₂. *Journal Toxicol Environ Health*, 1993, 38: 273-92.
99. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. *Hayat Araştırma Dergisi*, 1998, 8: 34-38.
100. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinic Chemistry*, 1995, 41/12: 1819-1828.
101. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Medical Science Monit*, 1998, 4: 1089-1095.
102. Akkuş T. *Serbest radikaller ve fizyopatoljik etkileri*. Baskı. Mimoza Yayınları, Konya 1995: 1-80.
103. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinich Chemistry*, 1991, 37: 1932-7.
104. Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian Journal Vetheriner Medical*, 2005, 8: 1-11.
105. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1982, 47: 412-426.
106. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Journal Turkish Nephrol Associate*, 1997, 3-4: 92-95.

107. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine Oxidase Formation during Experimental Ischemia of the Equine Small Intestine. *Canada Journal Vetheriner Res*, 1991, 55: 310-314.
108. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants. *Journal Nutrient*, 2004, 134: 3143–3163.
109. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklundi S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *Journal Biological Chemistry*, 1999, 274: 4985–4994.
110. Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *Journal. Amer Soc Nephrology*, 1991, 1: 959-969.
111. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postistemic tissue injury. *The New England Journal Medicine*, 1985, 312: 159-163.
112. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *Journal Biologic Chemistry*, 1971, 25: 7825.
113. Hung-Hai K, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biol And Med*, 1993, 15: 621-627.
114. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1999, 1: 1-4.
115. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *Journal Biosci*, 1990, 15: 211–215.

116. Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *Journal American Soc Nephrology*, 2003, 14: 221–226.
117. Comporti M. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation*, 1985, 53: 599-623.
118. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *Journal Biology Chemistry*, 1987, 262: 8220-8226.
119. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Annals Emergency Medicine*, 1986, 15: 1075-83.
120. Goulart M, Batoreu MC, Rodriguez AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagen*, 2005, 20: 311–31.
121. Long CA, Bislskl HJ. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species. *Journal Physcial Chemistry*, 1980, 84: 555-557.
122. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik öemi. *Cerrah Paşa Tıp Dergsi*, 2004, 35: 140-149.
123. Dalle-Donne İ, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clini Chemistry Acta*, 2003, 329: 23–38.
124. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki JM, Dean RT. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochemistry Journal*, 1992, 282: 621-624.
125. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 181-182: 219-222.

126. Epe B, Ballmaier D, Adam W, Grimm GN, Saha-Möller CR. Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 1625–1631.
127. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemistry Journal*, 1998, 335: 85-94.
128. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroğlu M, Lunec J. Oxidative DNA Damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 2003, 17: 1195-1214.
129. Knaapen AM, Güngör N, Schins RPF, Borm PJA, Schooten FJV. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006, 21: 225–236.
130. Knaapen AM, Schins RPF, Polat D, Becker A, Borm PJA. Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 234/235: 143–151.
131. Steinman HM. *Superoxide Dismutase*. Baskı. Boca Raton, CRC Press, 1982: 12-68.
132. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996, 55: 45-54.
133. Church DF, Prior WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985, 64: 111-126.
134. Vartia KO. *Antibiotics in lichens*. Baskı. Ahmadjian, The Lichens, 1973.
135. Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastro-intestinal mucus. *Lancet*, 1984: 1328-1329.
136. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 1994, 344: 721-724.

137. Tanas S. Deneysel Olarak Enflamasyon Oluşturulan Ratlarda *Peltigera rufescens* (WEİS) Humb. İsimli Likenden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin Antioksidant Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Erzurum: Atatürk Üniversitesi 2007.
138. Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. 4 Baskı. Canada, Harcourt/Academic Press, 2002.
139. Stryer L. *Biochemistry*. 3 Baskı. 1988: 437-439.
140. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ. *Biyokimya*. Baskı. Erzurum, Aktif yayınevi, 2000: 348-470.
141. Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol*, 2000, 53: 9-17.
142. Odabaşoğlu F. , Antioksidan Vitaminler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 8 Mart 1999, Erzurum.
143. Montgomery R, Conway T.W, Spector AA. *Biochemistry*. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2000: 84-450.
144. CCAC, Ottawa ON. *Guide to the care and use of experimental animals Canadian Council on Animal Care*. Baskı. Canada, Bradda Printing Services 1993.
145. van Zutphen L.F.M, Baumans V, Beynen A.C. *Principles of Laboratory Animal Science. Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri* Baskı. Ankara Medipres, 2003: 101-109.
146. Marzacco S, Rosanna DP, Ivana S, Raffaella S, Rosaria M, Giuseppina M, Salvatore C, Aldo P, Giuseppina A. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Euro J Pharmacol*, 2004, 484: 321-350.

147. Alarcón de la Lastra C, Nieto A, Martin MJ, Cabré JF, Herrerías M, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm. Res*, 2002, 51: 51–57.
148. Abdel-Wahab MH, Arafa HMM, El-Mahdy MA, Abdel-Naim AB. Potential protective effect of melatonin against dibromoacetonitrile-induced oxidative stress in Mouse stomach. *Pharm Res*, 2002, 46: 287-293.
149. Aebi H. Catalase. *Method Enzymol*, 1984, 105: 121-126.
150. Sun Y, Larry WO, Ying LA. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988, 34: 497-500.
151. Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal Biochem*, 1968, 25: 192-205.
152. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351-358.
153. IBM. SPSS 20.0: 2012.
154. Champe PC, Harvey RA. *Lippincott's Illustrated Review Biyokimya*. Çeviri: Tokulligil A, Dirican M, Ulukaya E. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1997: 300-350.
155. Uzkeser H, Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Polat B, Yuksel TN, Ozaltin S, Atalay F. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Salbutamol on Acute and Chronic Models of Inflammation in Rats: Involvement of an Antioxidant Mechanism. *Mediators of Inflammation*, 2012.
156. Wang SY, Lan XY, Xiao JH, Yang JC, Kao YT, Chang ST. Antiinflammatory activity of *Lindera erythrocarpa* fruits. *Phytotherapy Research*, 2008, 22: 213-216.

157. Kalayarasan S, Prabhu PN, Sriram N, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *European Journal Of Pharmacology*, 2009, 606: 162-171.
158. Jatwa R, Kar A. Anti-inflammatory and anti-peroxidative roles of diacerein are possibly mediated through an alteration in thyroid functions in animal model of inflammation. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2009, 23: 465-471.
159. Tsao R, Yang R, Young JC. Antioxidant isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51: 6445-6451.
160. Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, Ohara N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytotherapy Research*, 2007, 21: 452-456.
161. Arumugam P, Priya NG, Subathra M, Ramesh A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 2008, 26: 92-95.
162. Chang WT, Huang WC, Liou CJ. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry*, 2012, 134: 972-979.
163. Chaudhuri AKN, Karmakar S, Rey D PS, Pal M, Sen T. Anti-inflammatory activity of Indian black tea (sikkim variety). *Pharmacol Res*, 2005, 51: 169-175.

164. Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Halici M, Atalay F, Cakir A, Cadirci E, Bayir Y, Suleyman H. alpha-Lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *British Journal Of Nutrition*, 2011, 105: 31-43.
165. (ed) UŞİPDTİ. Temel ve klinik mikrobiyoloji. *İstanbul: Güneş kitapevi*, 1999: 119-325.
166. Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carragenan induced brain inflammation. *J Neurosurg*, 1986, 65: 679-685.
167. Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi MM. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res*, 2005, 51: 95-105.
168. Martin-Garcia C, Hinojosa M, Berges P, Camacho E, Garcia-Rodriguez R, Alfaya T, Iscar A. Safety of a cyclooxygenase–2 inhibitor in patients with aspirin-sensitive asthma. *Chest*, 2002, 121: 1812-1817.
169. Vajja BN, Juluri S, Kumari M, Kole L, Chakrabarti R, Joshi VD. Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agent. *Int Immunopharmacol*, 2004: 901-909.
170. Neto AG, Costa JMLC, Belati CC, Vinholis AHC, Possebom LS, Da Silva Filho AA, Cunha WR, Carvalho JCT, Bastos JK and Silva MLA. Analgesic and antiinflammatory activity of a crude root extract of *pfaffia glomerata* (spreng) pedersen. *J Ethnopharmacology*, 2005, 96: 87-91.
171. Takeuchi A, Kobayashi K, Y Y. Role of protease, protease-inhibitor-complexes in inflammation. *International Journal of Tissue Reactions-Experimental and Clinical Aspects*, 1984, 6: 1-8.

172. Ben-Sreti MM, Gonzalez JP, Sewel RDE. Effect of elevated calcium and calcium antagonists on 6-7 benzomorfan-induced analgesia. *Eur J pharmacol*, 1983, 75: 385-390.
173. Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi MM. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res*, 2005, 51: 95-105.
174. Odabasoglu F, Halici M, Suleyman H, Bayir Y, Cakir A. The effects of some vegetable oils on indomethacine-induced gastric damages and carrageenan-induced paw odema. *Febs Journal*, 2006, 273: 301-301.
175. Tanas S, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aygun H, Aslan A, Suleyman H. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *Journal Of Natural Medicines*, 2010, 64: 42-49.
176. Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Biology and Medicine*, 1990, 9: 515–540.
177. Sirajudeen. K.N.S, Selvi. R.T, Devaraj H, Devaraj. S.N. The role of oxidative stres in amiodarone- induced lung and liver toxicity in the rat. *Medical Science Res*, 1998, 26: 619-621.
178. Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Moa J, Chen H, Bai H, Wu X, Zhao J, Zhang R. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *Journal of ethnopharmacology*, 2006, 108: 243–250.
179. Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand*, 1980, 492: 43.

180. Odabaşoğlu F, Küfrevioğlu Ö. İ. Effects of the treating with pesticides and plant hormones on catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Bulletin Pure and Applied Sciences*, 2001, 20B: 79-88.
181. Lu TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC, Peng WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycyne tomentella* root in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 2007, 113: 142–148.
182. Cuzzocrea S, Costantino G, Zingarelli B, Mazzon E, Micali A, Caputi A.P. The protective role of endogenous glutathione in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *European Journal Of Pharmacology*, 1999, 372: 187–197.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

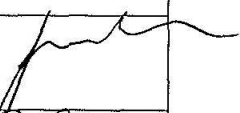
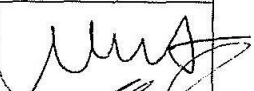
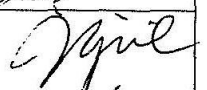
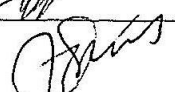
KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Emrullah DORMAN
Doğum Tarihi	: 10.04.1983
Doğum Yeri	: Erzurum
Medeni Hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C
Adres	: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM
Telefon	: 0442 231 5554
Fax	:
E- Posta	: emrullahdorman@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Erzurum Lisesi (2001)
Lisans	: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001-2005)
Yüksek Lisans	: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (2010-2012)
Doktora	:
YABANCI DİLBİLGİSİ	
İngilizce	: Orta derecede (UDS 55, Mart 2012)
	:
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
İLGİ ALANLARI, HOBİLER	
Kayak yapmak, balık tutmak, kitap okumak	

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

“2011. 2.1/36 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 27.04.2011

2.1/36- Enstitümüz Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Emrullah DORMAN’ ın “ **Maclura Pomifera Bitkisinden Elde Edilecek Ekstre ve Metabolitlerinin Ratlarda Karrageninle Oluşturulan Enflamasyon Modeli Üzerine Etkilerinin Araştırılması ve Antioksidan Mekanizmanın İncelenmesi** ” tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof.Dr.Türkan PASİNLİOĞLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. İsmail CEYLAN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr. Hakan USLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Raportör	