

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

**SİSPLATİNE BAĞLI KARACİĞER HASARINDA ÜZÜM
ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ VE ESANSİYEL KEKİK YAĞININ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Ümit ARSLANBAŞ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

**Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Şubat 2010
KAYSERİ**

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

**SİSPLATİNE BAĞLI KARACİĞER HASARINDA ÜZÜM
ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ VE ESANSİYEL KEKİK YAĞININ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Ümit ARSLANBAŞ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

**Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-09-1019 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2010
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN danışmanlığında **Ümit ARSLANBAŞ** tarafından hazırlanan “**Sisplatine Bağlı Karaciğer Hasarında Üzüm Çekirdeği Özütü ve Esansiyel Kekik Yağının Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / /

JÜRİ:

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN

Üye : Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Leylagül KAYNAR

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle aktaran, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını, değerli fikirlerini ve iyi niyetini esirgemeyen, çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysun ÇETİN'e;

Tezin hazırlanması süresince yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'dan Sayın Uzm. Dr. Recep SARAYMEN'e, Patoloji Anabilim Dalı'dan Sayın Doç. Dr. Özlem CANÖZ'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı'dan Sayın Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ'a, tüm DEKAM personeline ve projemizi TSY-09-1019 no'lu proje adı altında destekleyen Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonuna;

Büyük bir özveriyle, her zaman yanımda olan canım aileme;

Teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

SİSPLATİNE BAĞLI KARACİĞER HASARINDA ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ VE ESANSİYEL KEKİK YAĞININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Giriş ve Amaç: Sisplatin (CDDP), kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan, platin türevi bir ilaçtır fakat yüksek dozlarda karaciğer hasarı gibi istenmeyen yan etkilere sebep olabilir. Sisplatinin karaciğer dokusunda yaptığı hasarın altında yatan mekanizma büyük oranda serbest oksijen radikallerine bağlıdır. Üzüm çekirdeği özütünün (ÜÇÖ) ve esansiyel kekik yağının (EKY) çeşitli dokularda serbest radikal temizleyici ve antioksidan özelliklere sahip olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Biz bu çalışmada sıçanlarda sisplatin tedavisine bağlı oluşan karaciğer hasarında ÜÇÖ ve EKY'nın etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç-Yöntem: Doksanaltı adet Wistar albino cinsi erkek sıçan; her biri oniki hayvandan oluşan sekiz gruba bölünerek, gruplardaki sıçanlar on gün süreyle takip edildi. Kontrol grubu: Hem periton içine serum fizyolojik enjekte edildi hem de gavaj yoluyla distile su verildi. ÜÇÖ grubu: ÜÇÖ (100 mg/ kg/ gün), gavaj yoluyla verildi. EKY grubu: EKY (1 mg/ kg/ gün), periton içine enjekte edildi. Sisplatin grubu: Sisplatin (7 mg/ kg, 6. gün tek doz), periton içine enjekte edildi. ÜÇÖ+Sisplatin grubu: ÜÇÖ (100 mg/ kg/ gün) gavaj yoluyla verildi ve sisplatin (7 mg/ kg, 6. gün tek doz), periton içine enjekte edildi. EKY+Sisplatin grubu: EKY (1 mg/ kg/ gün), periton içine enjekte edildi ve sisplatin (7 mg/kg, 6. gün tek doz), periton içine enjekte edildi. ÜÇÖ+EKY+Sisplatin grubu: ÜÇÖ (100 mg/ kg/ gün), gavaj yoluyla verildi. EKY (1 mg/ kg/ gün), periton içine enjekte edildi ve sisplatin (7 mg/ kg, 6. gün tek doz), periton içine enjekte edildi. ÜÇÖ+EKY grubu: ÜÇÖ (100 mg/ kg/ gün), gavaj yoluyla verildi ve EKY (1 mg/ kg/ gün), periton içine enjekte edildi. Onbirinci gün derin anestezi altında sıçanlardan karaciğer doku ve kan örnekleri alınarak ÜÇÖ ve EKY'nın, sisplatin tedavisine bağlı oluşan karaciğer hasarı üzerindeki etkileri araştırıldı. Sıçanlar öldürülmeden önce alınan intrakardiyak, kan örneğinden elde edilen serumlarda; karaciğer fonksiyonlarının göstergesi olan serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri çalışıldı. Sıçanlar öldürüldükten hemen sonra çıkarılan karaciğer dokularında; oksidatif stres belirteci malondialdehit (MDA) ile antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri çalışıldı. Karaciğer doku örneklerinin ikinci grubu fikse edilip bir seri histopatolojik işleminden geçirildikten sonra, ışık mikroskobunda morfolometrik ve histopatolojik olarak incelenip değerlendirildi.

Bulgular: Sisplatin grubunda serumda ALT ve AST düzeylerinde artış, MDA düzeylerinde yükselme ve SOD ile GSH-Px'ı içeren antioksidan enzim düzeylerinde azalmayla biyokimyasal olarak ($p < 0,001$), ışık mikroskobu altında ise histopatolojik olarak ($p < 0,05$) karaciğer hasarı gösterildi. ÜÇÖ verilmesiyle karaciğer hasarında belirgin düzelme saptandı yine EKY verilmesiyle ÜÇÖ kadar olmasa da düzelmeler olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$).

Sonuç: Bu sonuçlara göre sisplatin ile oluşturulan karaciğer hasarının temelinde antioksidan savunma sisteminin bozulması söz konusudur. Güçlü bir antioksidan olan ÜÇÖ burada koruyucu bir etkinlik gösterirken, EKY da kısmen koruyucu özelliktedir. Sisplatin'e bağlı karaciğer hasarında ÜÇÖ ve EKY'nın kesin tedavi edici ilaçlar olarak değerlendirilebilmesi için henüz çok erkendir. Bu nedenle farklı doz, farklı süre ve farklı denek sayılarıyla yeni çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, Hepatotoksisite, Serbest Radikaller, Üzüm, Kekik.

EFFECTS OF GRAPE SEED EXTRACT AND *ORIGANUM ONITES* ESSENTIAL OIL ON CISPLATIN-INDUCED HEPATOTOXICITY

ABSTRACT

Background: Cisplatin (CDDP), derived from platinum, is a widely used anticancer drug but a high dose, it can produce undesirable effects, such as hepatotoxicity. The underlying mechanism in hepatotoxicity has been attributed to free oxygen radicals. Grape seed extract (GSE) and *Origanum onites* essential oil (OOEO) previously shown to have free radical scavenging and antioxidant properties in various tissues. We aimed to study the effects of GSE and OOEO on the cisplatin induced hepatotoxicity in rats.

Materials and Methods: 96 male Wistar albino rats were divided into 8 groups, 12 rats in each and followed up for 10 days. Control group: SF intraperitoneally, distilled water with gavage. GSE group: (100 mg/ kg/ day) with gavage. OOEO group: (1 mg/ kg/ day), intraperitoneally. CDDP group: (7 mg/ kg, single dose, on the 6th day), intraperitoneally. GSE+CDDP group: GSE (100 mg/ kg/ day) with gavage and CDDP group: (7 mg/ kg, single dose, on the 6th day), intraperitoneally. OOEA+CDDP group: OOEO (1 mg/ kg/ day), intraperitoneally and CDDP (7 mg/ kg, single dose, on the 6th day), intraperitoneally. GSE+OOEO+CDDP group: GSE (100 mg/ kg/ day) with gavage, OOEO (1 mg/ kg/ day), intraperitoneally and CDDP (7 mg/ kg, single dose, on the 6th day), intraperitoneally. GSE+OOEO group: GSE (100 mg/ kg/ day) with gavage, OOEO (1 mg/ kg/ day), intraperitoneally. On the 11th day liver tissue and serum samples were obtained from rats under deep anaesthesia and the effects of GSE and OOEO on cisplatin induced hepatotoxicity, were examined. Serum ALT, AST levels were measured to evaluate the liver function. In rat liver specimens the levels of malondialdehyde (MDA), end product of lipid peroxidation and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined spectrophotometrically. In second rat liver specimens has been fixed and examined histopathologically by the light microscopic levels.

Results: Cisplatin hepatotoxicity was manifested histopathologically under the light microscope ($p < 0,05$) and biochemically by an increase in serum ALT and AST, elevation of MDA in liver tissues as well as a decrease in the activities of antioxidant enzymes, including SOD, GSH-Px in liver tissues ($p < 0,001$). In the GSE group, significant improvements were observed compared with the cisplatin group. In the OOEO group, there were also some improvements but to a lesser degree compared with the GSE group ($p < 0,001$).

Conclusion: In keeping with the results, the main underlying mechanism in CDDP-induced hepatotoxicity appears to be due to hepatocyte damage. GSE and OOEO appeared to induce a beneficial therapeutic effect in this study. However, we can not yet consider GSE and OOEO to be a new therapeutic agent in CDDP hepatotoxicity until further studies with various doses, different time intervals, and more animal numbers have been provided.

Key Words: Cisplatin, Hepatotoxicity, Free Radicals, Grape, Thyme.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR.....	VIII
ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. SİSPLATİN (CİS-DİAMİNE DİKLOROPLATİNUM II= CDDP)	4
2.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	6
2.2.1. Serbest Radikaller	6
2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	6
2.2.3. Serbest Radikal Kaynakları.....	7
2.2.3.1. Potansiyel Endojen SOR Kaynakları	8
2.2.3.2. Potansiyel Ekzojen SOR Kaynakları	8
2.2.4. Başlıca SOR Ürünleri ve Biyokimyası	9
2.2.4.1. Moleküler Oksijen (O ₂).....	9
2.2.4.2. Süperoksit Radikali (O ₂ ^{-•}).....	9
2.2.4.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	10
2.2.4.4. Hidroksil Radikali (OH [•])	11
2.2.4.5. Peroksil Radikali (RO ₂ [•])	11
2.2.5. Serbest Radikallere Bağlı Hücre Hasarı	12
2.2.5.1. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	12
2.2.5.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	12
2.2.5.3. Lipitler Üzerine Etkileri	12
2.2.5.4. Proteinler Üzerine Etkileri	13
2.2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	14
2.2.6.1. Enzimatik Savunma Sistemleri	15
2.2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC: 1.15.1.1).....	15
2.2.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC: 1.11.1.9)	15
2.2.7. Üzüm (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	15
2.2.7.1. Kimyasal Yapısı ve Biyoaktif Bileşenleri.....	16
2.2.7.2. Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri	18
2.2.7.2.1. Antioksidan Etkileri	18
2.2.7.2.2. Hepatoprotektif Etkileri	19

VII

	<u>Sayfa no</u>
2.2.8. Kekik (<i>Origanum onites</i> L.)	19
2.2.8.1. Kimyasal Özellikleri	20
2.2.8.2. Antioksidan ve Hepatoprotektif Etkileri	22
2.2.9. Aminotransferazlar	23
3.GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1.GEREÇ	25
3.1.1. Deney Hayvanları	26
3.1.2. Üzüm Çekirdeği Özütü (ÜÇÖ)' nün Kaynağı-Hazırlanışı	26
3.1.3. Esansiyel Kekik Yağı (EKY)'nın Kaynağı-Hazırlanışı	27
3.2. YÖNTEM	27
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması, EKY ve ÜÇÖ ile Sisplatinin Uygulanması	27
3.2.2. Karaciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	29
3.2.3. Total Protein Tayini	29
3.2.4. Doku MDA Tayini.....	32
3.2.5. Standart Serinin Hazırlanması	32
3.2.6. SOD Aktivitesi Tayini	33
3.2.7. Standart Serinin Hazırlanması	35
3.2.8. GSH-Px Aktivitesi Tayini.....	36
3.2.9. Aminotransferaz Ölçüm Yöntemleri.....	38
3.2.9.1. ALT Ölçüm Yöntemi.....	38
3.2.9.2. AST Ölçüm Yöntemi	39
3.3. ÇALIŞILAN YÖNTEMLERİN GÜVENİLİRLİĞİ (CV DEĞERLERİ).....	39
3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	42
4.1.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	42
4.1.1.1. MDA Düzeyleri	43
4.1.1.2. SOD Aktiviteleri	44
4.1.1.3. GSH-Px Aktiviteleri	45
4.1.2. Aminotransferaz Düzeyleri	46
4.1.2.1. ALT Enzim Düzeyleri.....	47
4.1.2.2. AST Enzim Düzeyleri.....	48
4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	49
4.2.1. Histopatolojik Değerlendirme	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	

VIII

KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
bcl-XL	: Dominant apoptozis düzenleyici
BSA	: Sığır serum albümini
d	: Doz
dk	: Dakika
EC	: Enzim kodu
GSH	: Glutasyon
GSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GSSH	: Redükte glutasyon
H ⁺	: Hidrojen iyonu
ip	: İntraperitoneal enjeksiyon
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NADP	: Nikotinamid adenzin difosfat
nmol	: Nanomol
pH	: Ortamın asitlik bazlık derecesi indeksi
po	: Perioral
ppm	: Miligram/ Litre
g	: Yerçekimi ivmesi
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
v/ v	: Hacim/ Hacim
w/ v	: Ağırlık/ Hacim
µM	: Mikromolar

ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 2.1. Sisplatinin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2. Sisplatinin etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücrel kaynakları ve hasarının şematik gösterimi	7
Şekil 2.4. Flavonoidin yapısı	16
Şekil 2.5. <i>Trans</i> -resveratrol ve <i>cis</i> -resveratrol.....	17
Şekil 2.6. Önemli bazı biyoaktif üzüm bileşenlerinin kimyasal yapıları	17
Şekil 2.7. Bazı terpenlerin molekül yapıları	21
Şekil 2.8. AST ve ALT'nin katalizlediği tepkimeler.....	24
Şekil 3.1. Çalışmanın şematik olarak ifade edilmesi	28
Şekil 3.2. Total protein standart eğrisi.....	31
Şekil 3.3. MDA standart grafiği	33
Şekil 3.4. SOD inhibisyon grafiği.....	35
Şekil 3.5. Logaritmik SOD- inhibisyon grafiği	36
Şekil 4.1. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.....	43
Şekil 4.2. Karaciğer dokusu SOD aktiviteleri.....	44
Şekil 4.3. Karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri	45
Şekil 4.4. Serum ALT düzeyleri.....	47
Şekil 4.5. Serum AST düzeyleri	48
Tablo 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	14
Tablo 2.2. Türkiye’de yetişen <i>Origanum onites L.</i> esansiyel yağ kompozisyonu.....	22
Tablo 3.1 Kullanılan yöntemlerin CV değerleri	40
Tablo 4.1. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu oksidatif stres parametreleri	42
Tablo 4.2. Araştırma gruplarının serum aminotransferaz düzeyleri.....	46
Tablo 4.3. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu histopatolojik değerlendirme sonuçları	49
Resim 4.1. Karaciğer hasarının mikroskopik değerlendirmesi.....	51

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser; normal hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması, invaziv nitelik kazanması, metastaz yapması ile kendini gösteren ve kalp hastalıklarından sonra tüm ölümlerin ikinci en sık sebebi olan ölümcül bir hastalıktır (1,2).

Kanser; tipine ve gelişim evresine bağlı olarak cerrahi çıkartım, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin ya tek başına ya da kombine uygulamalarıyla tedavi edilmektedir (3).

Kemoterapötik ajanlar çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmakta olup; alkilleyiciler, antimetabolitler, mitotik inhibitörler, antibiyotikler, enzimler, hormonlar ve hormon antagonistleri gibi çeşitli kategorilere ayrılırlar ve etki mekanizmaları birbirinden farklıdır (4).

Antineoplastik kemoterapi; tümör hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını durdurarak tamamen yok edebilen bir tedavi şekli olmasının yanısıra, normal hücre ile tümör hücresi arasındaki yapısal benzerlikler nedeniyle normal hücrelere de zarar verebilmektedir (2).

Sisplatin; yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen, organik platin türevi bir ilaç olup; özellikle baş-boyun, testis, yumurtalık kanserleri ile mesane, prostat,

serviks, özefagus, osteojenik sarkom, nöroblastoma ve küçük hücreli akciğer tümörleri gibi bir çok solid tümörün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4-6).

Kullanımını sınırlayan en önemli yan etkilerinin başında; nefrotoksisite, nörotoksisite, karaciğer hepatotoksisitesi, testis dokusu toksisitesi, şiddetli bulantı-kusma, iştahsızlık ve diyare gibi gastrointestinal bozukluklar ile miyelosupresyon, kemik iliği supresyonu ve ototoksisite sayılabilir. Özellikle, akut tübüler nekroza eşlik eden nefropati ve nefrotoksisite sisplatinin klinik kullanımını kısıtlayan en önemli faktörlerin başında gelir (4,6-9).

Hepatotoksisite; sisplatin için doz sınırlayıcı bir faktör olarak kabul edilmediğinden, fazla dikkate alınmamış ve bu yönde çok az çalışma yapılmıştır. Hepatotoksisite, ilacın yüksek dozlarda uygulanmasından sonra gözlenmektedir ve hastanın klinik durumunda önemli değişiklikler meydana getirebilmektedir. Sisplatin hepatotoksisitesinin patofizyolojisinde; oksidatif stresin önemli rol oynadığı, karaciğer ve böbrek dokusunda lipid peroksidasyon artışına neden olduğu tespit edilmiştir. Sisplatin; hidroksil ve süperoksit gibi bazı reaktif oksijen türlerini üreterek, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi bazı aktif antioksidan enzimleri inhibe edip, glutatyon düzeyini düşürebilmektedir. Birtakım koruyucu ajanlar antitümör ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır. Sisplatinin oluşturduğu hepatotoksisiteye karşı korunmada da çeşitli antioksidanlar kullanılmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (7,10).

Bitkisel tedavi yöntemleri; kanser tedavisi süresince uygulanan destekleyici ve alternatif tedavi yöntemlerinden birisi olup, gerek ülkemizde gerekse dünyada oldukça sık uygulanmaktadır. Ancak, doğal yollarla elde edilen ve yan etkileri az olan bu ilaçların, klinik kullanıma geçirilmeden önce; çok dikkatli bir şekilde araştırılıp, tedavi seçiminde yararı bilinen ve yan etkisi olmayan uygulamaların tercih edilmesi gerekmektedir (11-13).

Üzüm çekirdeği özütü (ÜÇÖ)'nün özellikle; kardiyoprotektif, hepatoprotektif, ve nöroprotektif etkileri kadar antioksidan, anti-enflamatuar ve antimikrobial aktiviteler gibi geniş spektrumlu, farmakolojik ve terapötik etkileri olduğu bilinmektedir (14).

Esansiyel kekik yağı (EKY)'nın ise; içerdiği karvakrol ve rozmarinik asit gibi, serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan fenolik bileşiklerden kaynaklanan

antioksidan özelliği ile hepatoprotektif etki gösterdiği, ayrıca kanserden korunmada da etkili olduğu bildirilmiştir (15,16).

Sisplatin'in hepatotoksik etki mekanizmasını açıklamak amacıyla, sıçan modeli üzerinde yapılan bu çalışmada; sisplatin uygulanan sıçanlarda oksidatif stresin varlığı araştırılarak, antioksidan özelliği olan ÜÇÖ ve EKY'nın; sisplatin'in yol açtığı toksisite üzerindeki muhtemel etkilerinin, hem ayrı ayrı hem de kombine uygulamalarla değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

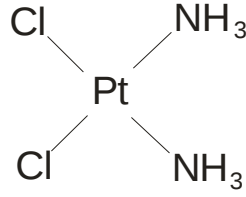
2.1. SİSPLATİN (*CIS*-DİAMİNE DİKLOROPLATİNUM II= CDDP)

Sisplatin, Rosenberg ve arkadaşlarının 1965 yılında yaptığı bir çalışma sayesinde keşfedilmiştir. Elektriksel alanın *E.coli* bakterisinin çoğalması üzerindeki etkileri incelenirken; platin elektrotlardan elektrolit ortama geçen platin türevlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etkilerinin de olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum; bakterilerin bölünmesini durduran ilacın, çok hızlı büyüyen tümörlerdeki hücre bölünmesini de durdurabileceğini düşündürmüştür (17).

İlk olarak, 1970’li yıllarda önemi anlaşılan sisplatin; klinikte en yaygın kullanılan antineoplastik ilaçlardan biri olagelmıştır (6-8).

Sisplatin; baş-boyun, mesane, prostat, serviks, özefagus, ilerlemiş yumurtalık kanserleri, nonseminomatöz testis tümörleri, osteojenik sarkom ve nöroblastoma solid tümörleri gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan, oldukça geniş spektrumlu, potansiyel bir antineoplastik ajandır (2,4-6,10,18).

Sisplatin (*cis*-diaminedikloroplatinum (II), *cis*-platinum (II), *cis*-DDP), merkezdeki iki değerlikli platin atomuna bağlı iki amonyum ve iki klor bağı içerir (Şekil 2.1.). Bileşik, *cis* ve *trans* olmak üzere iki izomere sahiptir. Bunlardan sadece *cis* formu sitotoksiktir (19).



Şekil 2.1. Sisplatinin kimyasal yapısı

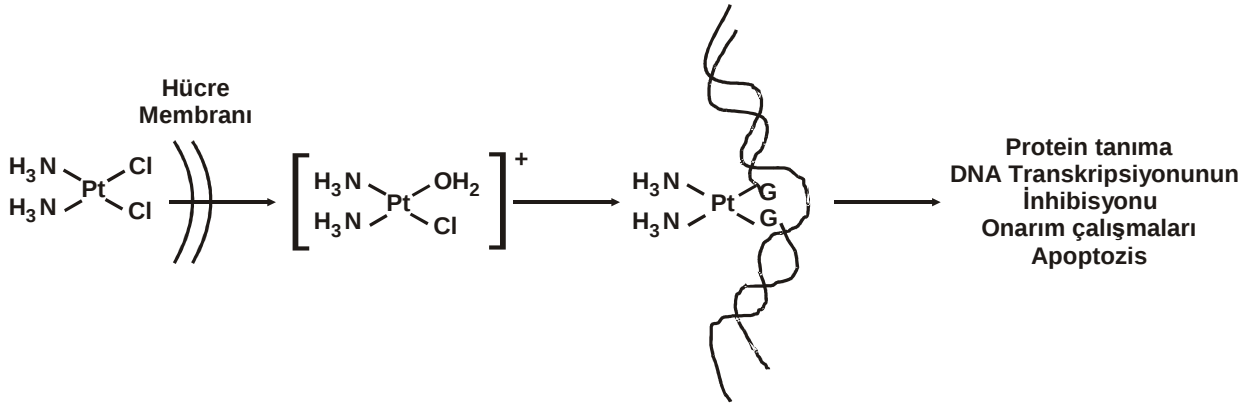
İlacın etkinliği, ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. Klor iyonu konsantrasyonunun yaklaşık 100 mM olduğu kanda ve ekstraselüler sıvılarda sisplatin daha az etkindir. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonundaki ani düşüşler, ilacın etkinliğinin artmasına neden olur (17).

Sisplatinin antitümöral ve nefrotoksik etkisi; hücreye difüzyon yoluyla girerek, hücre içerisinde, reaktif monoakua-diamine-platin veya diaqua-diamine-platin türlerine hidrolize olmasından kaynaklanmaktadır (20). İlacın nükleik asit ve proteinler ile tepkimeye girebilen aktif şekillerini oluşturabilmek için su aracılığıyla yer değiştiren klor atomları aktif rol oynar. Sulu ortamda çiftleşmemiş elektron içeren oksijen, sülfür ve nitrojen atomları gibi nükleofilik gruplar, klor iyonlarıyla yer değiştirmek üzere platine bağlanır. Bağlanan gruplar deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA)'nın pürin bazında ve birçok aminoasit yan zincirlerinde yer alır (17).

Sisplatin DNA ile etkileşerek birçok zincir içi ve zincirler arası çapraz kovalent bağlar oluşturur. Guanin bazının, oldukça reaktif olan 7. azot atomu ile kolayca tepkimeye girer. Sisplatin, en sık aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çapraz bağ [*cis*-platinum diamine-d(GpG)] oluştururken; ikinci sıklıkta, guanin-adenin çapraz bağları [*cis*-platinum diamine-d(ApG)] oluşturur. Nadiren, zincirler arası çapraz bağ oluşturur. Sisplatinin antineoplastik etki mekanizması, ilacın DNA ile kovalent bağlar oluşturarak hücre siklusunu G₂ fazında durdurması ve apoptozisi tetiklemesi şeklinde açıklanmıştır (21).

DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eden çapraz bağlar, sisplatinin hem terapötik etkisi hem de hücrel toksisitesi açısından önemli olup DNA zincirinin kıvrılarak açılmasını sağlar. Böylece DNA molekülü; DNA onarıcı proteinler ile histonları, mobilitesi yüksek grupları ve diğer protein gruplarını kendisine çeker. Sisplatinin modifiye ettiği DNA yeterince yenilenemediğinden, söz konusu proteinlerin, oluşan DNA hasarına verdikleri sinyal apoptozisi başlatır. Söz konusu hasar onarılamayacak boyutlarda ise hücre tarafından tolere edilemez ve hücrenin ölümüne

neden olur (17,21). Sisplatinin etki mekanizması şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.2.) (22).



Şekil 2.2. Sisplatinin etki mekanizmasının şematik gösterimi

Vücuttan atılımı üriner yol ile olur. Alınışından itibaren % 35'i 5 günde atılır. Kalan kısmın atılımı ise daha uzun sürer. Miyelosupresif etkinliği orta dereceli olduğundan daha çok kombine olarak kullanılır. İntravenöz infüzyon (iv.) ve yavaş iv. enjeksiyon olarak 100 mg/ m² dozunda, kombine olarak ise 20 mg/ m² dozunda uygulanır (23).

2.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

2.2.1. Serbest Radikaller

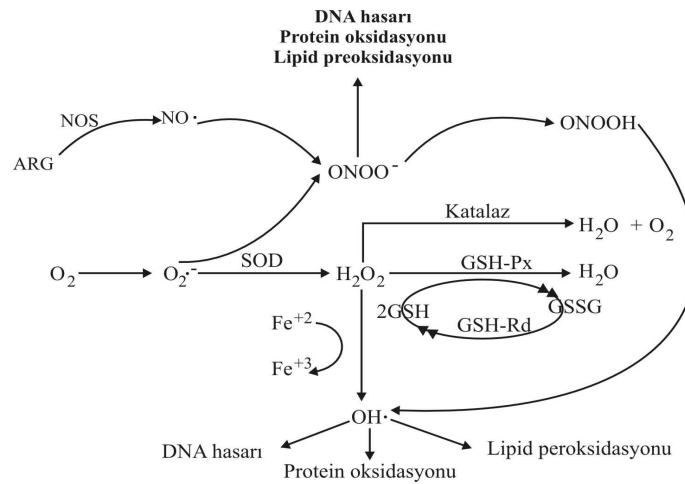
Fizyolojik veya patolojik etkiler sonucu mitokondride görülebilen; dış yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda çiftleşmemiş elektron içeren, kararsız ve son derece reaktif, nötr veya iyonize atom ya da moleküllere “serbest radikaller” (SR) denir (24,25). İlk keşfi 1900 yılında Gomberg tarafından yapılmış olan serbest radikallerin üretilmesi, patofizyolojinin önemli bir parçası olup, bir çok zenobiyotiğin toksisitesi de serbest radikallerin fazla üretilmesiyle ilgilidir (26). Serbest radikaller, organik veya inorganik yapıda olabilirler ve yarı ömürleri oldukça kısadır. Hem oksidan hem redüktan özellikte olup, tüm hücrel bileşenlere etki edebilirler (25).

2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen, canlılar için iki temel öneme sahiptir: Yapısal nitelikli olan birincil önemi; oksijenin, organizmaları ve besinleri oluşturan moleküllerin yapıtaşını teşkil eden başlıca element olmasından kaynaklanmaktadır ve bu durum tüm canlılar için geçerlidir. Oksijen, her canlı yapısındaki atomların yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır (27). Oksijenin fonksiyonel nitelikli ikincil önemi ise; oksijenin, canlılardaki

oksidoredüksiyon tepkimelerinde ve solunum sisteminde temel rolü oynamasından kaynaklanmaktadır.

Aerob organizmaların mitokondriyal elektron taşıma sisteminin son elektron alıcısı olan oksijen; fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, metabolik aktivite süresince hücrenin tüm fraksiyonlarında son derece reaktif olan ve “serbest oksijen radikalleri” (SOR) olarak adlandırılan çok sayıda toksik ara ürünün oluşmasına neden olabilir. Oksijenin radikal olan ve olmayan türevlerini kapsayan SOR, organizmadaki tüm hücresel komponentlere zarar vererek çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Fizyolojik koşullar altında, organizmadaki oksidan ve antioksidan sistemler dengesinin, herhangi bir nedenle oksidanlar lehine bozulması “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır (24,25). Hücrenin doğal fonksiyonlarını yürütebilmesi için gereken ve oksijen kadar önemli olan moleküllerden bir diğeri de nitrojendir. Nitrojenin de oksijen gibi; endojen veya ekzojen kaynaklı nedenlere bağlı olarak, hücreyi hasarlayabilen serbest radikallere dönüşmesine “nitrozatif stres” denir. Gerek SOR, gerekse serbest nitrojen radikalleri (SNR); hücre metabolizmasının doğal ürünleridir. Ancak, yararlı ve zararlı etkileri bir arada içerdiklerinden, biyolojik sistemlerde ikili rol oynamaktadırlar (Şekil 2.3.) (28).



Şekil 2.3. Serbest radikallerin hücresel kaynakları ve hasarının şematik gösterimi

2.2.3. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikallerin üretimi, endojen veya ekzojen kaynaklı olmak üzere iki grupta incelenebilir.

2.2.3.1. Potansiyel Endojen SOR Kaynakları

Sitokrom P-450, mitokondri, endoplazmik retikulum, mikrozomlar ve peroksizomlar ile enflamatuvar hücre aktivasyonu potansiyel SOR kaynaklarıdır. Sitokrom P-450 uyarılırsa, süperoksit ve hidrojen peroksit radikali üretebilir. Vücuttaki süperoksidin temel kaynağı olan mitokondri, hidrojen peroksit radikali de üretebilmektedir. Hidrojen peroksitin yarıdan fazlası mikrozomlarda üretilmektedir.

SOR ürünleri, karaciğer metabolizması esnasında, Kupffer hücre aktivasyonu aracılığıyla serbestleşen sitokinler benzeri moleküllerin neden olduğu tepkimeler sırasında da oluşabilmektedir.

Sitoplazmada bulunan NADPH-oksidaz ve molibdo-flavoenzimler grubundan olan ksantin-oksidaz gibi oksidan enzimler de başlıca potansiyel SOR kaynaklarıdır. Ksantin-oksidaz hipoksantini ürik aside katalizler. Aynı zamanda araşidonik asit metabolizması ürünü olan süperoksit anyon radikali, bu tepkimenin ilk ürünü olup; ikinci ürün ise hidrojen peroksittir (29).

Mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulumdaki; siklooksigenaz, lipoksigenaz ve NADPH-oksidaz enzim aktiviteleri, peroksizomal ve lizozomal oksidazlar da SOR oluşumuna neden olmaktadır. Karbohidrat, lipid, protein ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin zincir tepkimeleri veya otooksidasyonu da, SOR üretimi açısından önemlidir (30).

2.2.3.2. Potansiyel Ekzojen SOR Kaynakları

Canlı hücrelerin elektromagnetik veya partiküllü radyasyona maruz kalması sonucunda, başta su olmak üzere radyasyonla taşınan yüksek enerjinin, hücreyi oluşturan bileşenlere aktarılmasıyla serbest radikal yapısında bileşikler oluşabilmektedir (31). Ayrıca, cıva, kadmiyum, nikel, krom, demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile zenobiyotikler de SOR oluşumuna neden olabilir (27,30,32).

Karbon tetraklorür (CCl_4), nitrik oksit, nitrojen dioksit, ozon, karbon monoksit, hipoklorit, kükürt dioksit, mineral tozlar, toksinler, bazı solventler, plumbajin, juglon, yangınlar, parakuat ve dikuat gibi herbisitler ile silika ve asbest lifleri gibi peroksizom proliferatörleri SOR miktarlarını artıran maddeler olmakla birlikte aynı zamanda karsinogeniktirler (32).

2.2.4. Başlıca SOR Ürünleri ve Biyokimyası

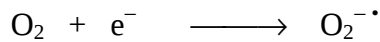
Biyolojik sistemlerde bulunan başlıca SOR ürünleri ve öncülleri şunlardır: Moleküler oksijen (O_2), singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksil veya perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksi radikali ($RO^{\cdot}$), alkilperoksi radikali ($RO_2^{\cdot}$), hipoklorit (ClO^-) ve nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)'tir. SOR terimi, OH ve O_2 gibi reaktif oksijen radikallerini kapsadığı kadar, $HOCl$, H_2O_2 ve 1O_2 gibi oksijenin radikal olmayan öncüllerini de kapsamaktadır (30,33):

2.2.4.1. Moleküler Oksijen (O_2)

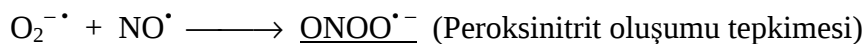
Moleküler oksijen (dioksijen) fazla reaktif değildir. Fakat O_2 'nin bu özelliği, onun diğer serbest radikallerle tepkimeye girmesini engellemez. İki molekül arasında oksidatif bir tepkimesin gerçekleşebilmesi için, Aufbau kuralına göre; bu moleküllerin eşleşmemiş elektronları, karşıt yönde salınmalıdır. Yani: O_2 ; organik moleküllerle tepkimeye girme eğiliminde değildir; bu nedenle direkt olarak sitotoksik sayılmaz (34,35). Ancak, çeşitli etkenlerle; O_2 'nin bu paralel salınan ortaklaşmamış elektronlarından birinin yönü tersine çevrilebilirse (1O_2 = singlet oksijen) veya O_2 bir elektron kazanırsa ($O_2^{\cdot-}$ = süperoksit), oldukça reaktif bir duruma gelir. Bu iki durum, organizmadaki bazı tepkimeler sırasında oluşabilir ve oldukça reaktif olan süperoksit veya singlet oksijen formları meydana gelebilir (27).

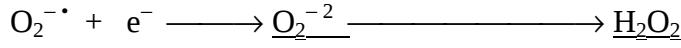
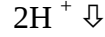
2.2.4.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijenin, bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda süperoksit radikali oluşur.

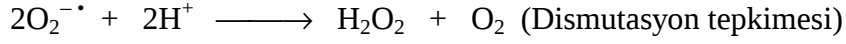


Süperoksit radikali, bir SOR ürünü olmakla birlikte organizmaya direkt olarak zarar vermez. Hidroksil ve hidrojen peroksit gibi diğer serbest radikallerin kaynağı olması açısından önemlidir. Haber-Weiss tepkimesi ile hidroksil radikaline, nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ile tepkimeye girerek peroksinitrite ($ONOO^{\cdot-}$) dönüşebilir. Hafif asidik ortamda spontan dismutasyonla veya süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüştürülerek detoksifiye edilir (29,36).





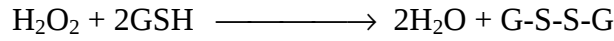
SOD



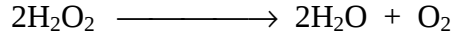
2.2.4.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Radikal tanımlamasına uymayan hidrojen peroksit, yüksüz olduğundan dolayı membranlardan kolaylıkla diffüzlenebilir ve uzun ömürlüdür (34,35). Özellikle, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir (35-37).

GSH-Px

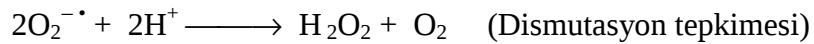


CAT



Hücre metabolizması sırasında; moleküler oksijenin iki elektron alarak indirgenmesiyle veya süperokside bir elektron katılmasıyla, peroksit radikali oluşur. Peroksit molekülü ise çevreden iki proton alarak hidrojen peroksidi oluşturur.

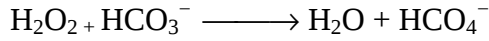
SOD



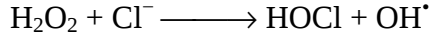
Hidrojen peroksit, tiroid biyosentezi ve makrofaj aktivitesi gibi bir çok hücrel metabolik olay açısından fonksiyonel öneme sahiptir. Mitokondriyal elektron taşıma sistemi tarafından mitokondrilerde üretilmesine rağmen, hücrelerde de eser miktarda bulunur. Nitrik oksit ile tepkimesinden, hidroksil radikali ve peroksinitrit oluşabilir. Demir (Fe) gibi geçiş metal iyonlarının varlığında “Fenton tepkimesi” vererek kendisinden daha reaktif olan hidroksil radikalini oluşturabilir.



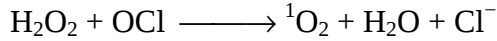
Bikarbonat anyonunu (HCO₃⁻), peroksi karbonat anyonuna (HCO₄⁻) ve suya (H₂O) dönüştürebilir.



Klorit iyonlarını (Cl^-) miyeloperoksidaz enzimi ile enzimatik olarak oksitleyip hipokloröz (HOCl) asit ve $\text{OH}^\bullet$ radikalini oluşturabilir.

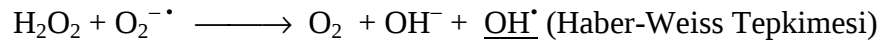


Hipokloröz asit ise, singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir (36,37).



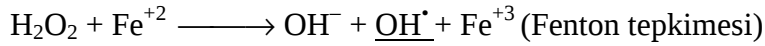
2.2.4.4. Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\bullet$)

Oksijen radikalleri içerisinde, en reaktif ve en sitotoksik olanıdır (38). İnsanlar için, hidroksil üretimi açısından bilinen en önemli olay Haber-Weiss veya Fenton tepkimesidir (35):

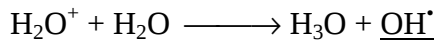
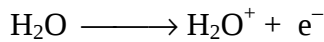


Sebebi olduğu DNA modifikasyonu sayısının yüzden fazla olduğu bilinmektedir. Hidroksil ($\text{OH}^\bullet$) radikali oluşturan başlıca üç mekanizma mevcuttur:

Haber-Weiss Tepkimesinin bir basamağı olan Fenton tepkimesi ile oluşabilmektedir.



İyonlaştırıcı radyasyonun ($h\nu$) suya etkisiyle oluşabilir.



Alkilhidroperoksitlerin fotolizi ile oluşabilmektedir (29,36).

2.2.4.5. Peroksil Radikali ($\text{RO}_2^\bullet$)

Hidroperoksil radikalinin konjüge asididir. Lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Proteinlerin yapısını bozarak, süperoksit anyon radikali ile ortak etkisi sonucu DNA hasarı oluşturabilir. (26,29,39).

2.2.5. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar

2.2.5.1. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Fazla miktarda SOR üretimi, DNA molekülünün tüm bileşenleri üzerinde değişikliklere neden olabilir. Çünkü: DNA, serbest radikaller için önemli bir hedeftir. Singlet oksijen ve özellikle hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca tepkimeye girerek; tek ve çift zincir kırılmalarına, baz dizilim değişikliklerine ve baz eksilmelerine neden olabilir. Hidroksil radikali; nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından, hidrojen atomu çıkarılması veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan süreçlerde rol alır. Bu olayların sonucunda ise; mutagenез, karsinogenез ve apoptozis oluşabilmektedir (28,40).

2.2.5.2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

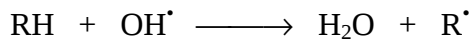
SOR'nin karbonhidratlar üzerine polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle de monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri mevcuttur. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu, hidrojen peroksit de dahil olmak üzere peroksitler ve okzaldehitler oluşmaktadır. Bu radikaller, tütün kullanma ve diyabetin neden olduğu patolojik durumlarda önemli rol oynarlar (41).

2.2.5.3. Lipitler Üzerine Etkileri

Bir tür otooksidasyon tepkimeleri zinciri olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikallerden biri aracılığıyla; membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) yan zinciri veya karbon zincirindeki metilen gruplarının birinden, bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Lipit peroksidasyonu zincir tepkimeleri üç aşamada gerçekleşebilir (29):

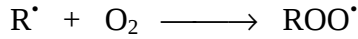
A- Başlangıç

Daha az reaktif olan süperoksit ve hidrojen peroksit bu tepkimeyi direkt olarak başlatamaz. Bu nedenle; lipit peroksidasyonu, $\text{OH}^\bullet$ radikalinin, çoklu doymamış yağ asidinden (RH) bir hidrojen çıkarmasıyla başlar:

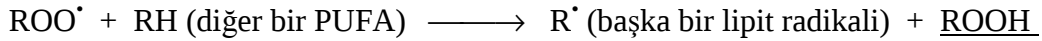


B- Yayılma

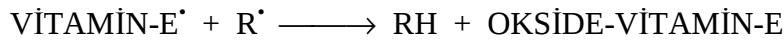
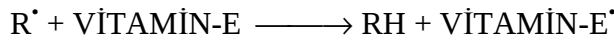
Oluşan lipit radikalinin ($\text{R}^\bullet$) oksijenle tepkimesi sonucu, lipit peroksil radikali ($\text{ROO}^\bullet$) meydana gelir.



Lipit peroksil radikalleri, lipit moleküllerinden hidrojen atomu çıkartarak lipit endoperoksitleri haline gelirler. Ardından membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini oksitleyerek yeni zincir tepkimeleri başlatırken; yeni lipit radikalleri oluşturarak, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (ROOH) dönüşebilirler.



C- Sonlanma: Tekrarlayarak yayılan bu tepkimeler; antioksidan maddelerle temas edene kadar stabil olarak kalırlar. Veya ikili lipit hidroperoksitleri kombine olarak, alkoller ve ketonlar gibi radikal olmayan türlere dönüşebilirler.



Üç veya daha fazla çift bağ içeren, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonlarına neden olabilir. Bu yüzden; membran deformasyonu, membran transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonları gibi patolojik sonuçlar doğurabilir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, karsinojenik ve genotoksik olabildiğini açıklamaktadır (42,43).

2.2.5.4. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinlerin, başta OH^- olmak üzere; tüm radikallerle kovalent etkileşimler sonucu değişikliklere uğramasına “protein oksidasyonu” denir. Protein oksidasyonuna neden olan mekanizmalar çeşitlilik arz etmektedir. SOR'nin, protein içi ve proteinler arası çapraz bağlar oluşturmak suretiyle, protein oksidasyonu yarattığı bilinmektedir. Özellikle; di-sistein çapraz bağları, sülfhidril gruplarının oksidasyonu ile oluşmaktadır. Ayrıca; radikal aktivite sonucu oluşan karbon merkezli radikallerin etkileşimleri, oksidasyona maruz kalmış proteinlerin karbonil grubuna lizinin amino grubunun eklenmesi ve di-tirozin oluşumu sayılabilir. Geçiş metalleri ise; hem aminoasit dizilerinin hem de serbest aminoasitlerin oksidasyonunu arttırarak, protein oksidasyonu yaratabilirler. Bunun yanı sıra, peroksinitrit radikali de protein oksidasyonunda aktif rol

oyunayan ajanlardan biridir. Proteinlerin oksidatif hasarı pek çok patolojik durumla sonuçlanmaktadır; kanser, Alzheimer sendromu, Parkinson, iskemi-reperfüzyon hasarı, karaciğer sirozu, yaşlanma bu sonuçların başlıcalarını teşkil etmektedir (29,40).

2.2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrelerde oksidasyon riski taşıyan molekülleri; kendi miktarından bağımsız olarak, oksidasyona karşı koruyan veya oksidasyonu geciktiren maddelere “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir (44). Antioksidanlar, endojen (doğal) ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir gibi, enzim ve enzim olmayanlar şeklinde yapılarına göre; çözünürlük özelliklerine ve organizmadaki dağılımlarına göre de sınıflandırılabilirler (Tablo 2.1.) (45,46).

Tablo 2. 1. Antioksidanların sınıflandırılması

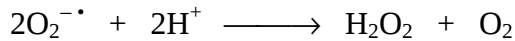
EKZOJEN ANTİOKSİDANLAR		
· Demir redoks döngüsünün inhibitörleri	· N-Asetilsistein (NAC)	
· Rekombinant antioksidan enzimler (r-SOD)	· Melatonin (MEL)	
· Ksantin oksidaz inhibitörleri	· Gıda Kaynaklı Antioksidanlar	
· NADPH-oksidaz inhibitörleri	· Demir şelatörleri (Desferroksamin)	
· NOS inhibitörleri	· Barbitüratlar	
	· Lokal anestezikler	
ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
I. ENZİMLER	II. ENZİM OLMAYANLAR	
· Süperoksit dismutaz (SOD)	• Lipit fazda çözünenler: α - tokoferol, β -karoten	
· Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	• Sıvı faz (sitozol, kan plazması)’da çözünenler:	
· Glutasyon redüktaz (GSSG-Rd)	· Askorbik asit	· Albümin
· Glukoz 6-P dehidrogenaz (G6PD)	· Glutasyon (GSH)	· Hemogloblin
· Katalaz (CAT)	· Ürat	· Miyogloblin
· Seruloplazmin	· Sistein	· Transferrin
· Glutasyon-S-transferaz	· Bilirubin	· Laktoferrin
· Tioredoksin redüktaz (TR)	· Bazı metal iyonları	· Ferritin
	(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+})	· Lipoik asit

Organizma açısından fonksiyonel önem taşıyan antioksidanlar, antioksidan savunma sistemlerinin bir parçasıdır.

2.2.6.1. Enzimatik Savunma Sistemleri

2.2.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC: 1.15.1.1)

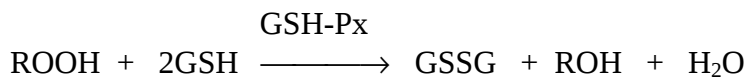
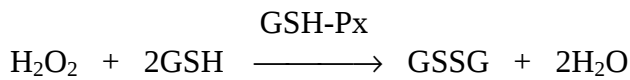
Özellikle, süperoksit radikali karşı koruyucu enzimler içerisinde en aktif olanıdır. Süperoksit radikalini, daha az reaktif olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirir:



SOD grubu enzimler, birer metaloenzim olup, süperoksit detoksifikasyonunda kofaktör olarak kullandığı metal iyonlarına göre adlandırılır: Cu/ Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD ve Ni-SOD gb. Cu/ Zn-SOD dimerik yapıda bir metaloenzim olup; iki alt ünitesinde Cu ve Zn bağlıdır ve özellikle sitozolde lokalizedir. Tetramerik yapıda olan Mn-SOD ise, özellikle mitokondride lokalizedir (26,47).

2.2.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC: 1.11.1.9):

Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu, selenyum içeren bir metaloenzimdir ve aktif merkezinde, selenosistein bulunduran sitozolik bir metaloproteindir. Enzimin substratı GSSH'dur. Ancak, enzim hem hidrojen peroksidi hem de organik peroksitleri substrat olarak kullanabilmektedir. Bu nedenle enzim; hidrojen peroksit ve hidroperoksitleri indirgemek için, glutasyonu kullanır. Karaciğerde en aktif; beyin, kalp ve akciğerde orta derecede aktif olup; kaslardaki aktivitesi en düşüktür. Bu enzim aşağıdaki tepkimeleri katalizler (48):



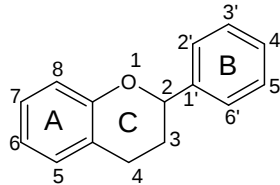
2.2.7. Üzüm (*Vitis vinifera* L.)

Bütün dünyada yaygın olarak en çok tüketilen meyvelerden biri olan üzümün anavatanı, güney Avrupa ve doğu Asya'dır. Günümüzde dünyanın tüm iklim kuşaklarında kültürü

yapılan üzüm asmasının çekirdekleri ve yaprakları bitkisel tedavide kullanılırken, meyvelerinden ise destek besin olarak yararlanılmaktadır (14,49).

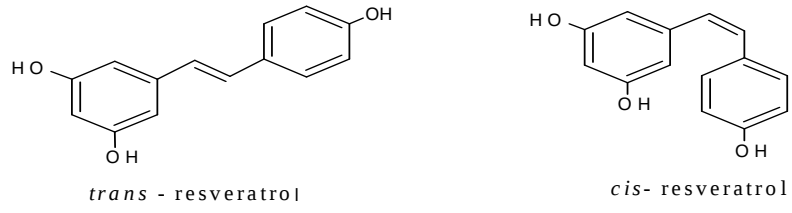
2.2.7.1. Kimyasal Yapısı ve Biyoaktif Bileşenleri

Üzümün temel bileşenlerini; su, şeker ve asitler oluşturmaktadır. Önemli miktarda su içeren üzüm meyvesinin; % 81-87'si su, % 12-18'i karbonhidratlar, % 0,5-0,6'sı proteinler, % 0,3-0,4'ü ise yağdan oluşmaktadır (49). Ayrıca, önemli miktarda potasyum (% 0,1-0,2), C vitamini (% 0,01-0,02), A vitamini (% 0,001-0,0015), eser miktarda da kalsiyum (0,001-0,002) ve fosfor içermektedir. Yapılan diyetel analizlerde, üzümün her 100 gramında; 78 kalorilik enerji, 0,5 g protein, 19 g karbonhidrat, yağlardan sağlanan kalori değerinin % 3'üne karşılık gelen 0,3 g yağ, 0,18 mg sodyum, 155 mg potasyum, 0,4 g lif, 13 mg kalsiyum, 9 mg fosfor ve 10 mg C vitamini bulunmuştur (50). Üzüm, aynı zamanda kemik sağlığı açısından önemli olarak nitelendirilebilecek elementlerden biri olan bor gibi pek çok besinin de temel kaynağıdır (51). Polifenoller ve polifenolik bileşiklerce zengin olan üzümün kompozisyonu; flavonoidler ve nonflavonoidler olarak iki kısımda incelenebilir. Flavonoidlerin yapısı; oksijen içeren bir piran halkasına (C) bağlı iki benzen halkasından meydana gelen (A ve B) bir flavan çekirdekten oluşmaktadır (Şekil 2.4.) (52).

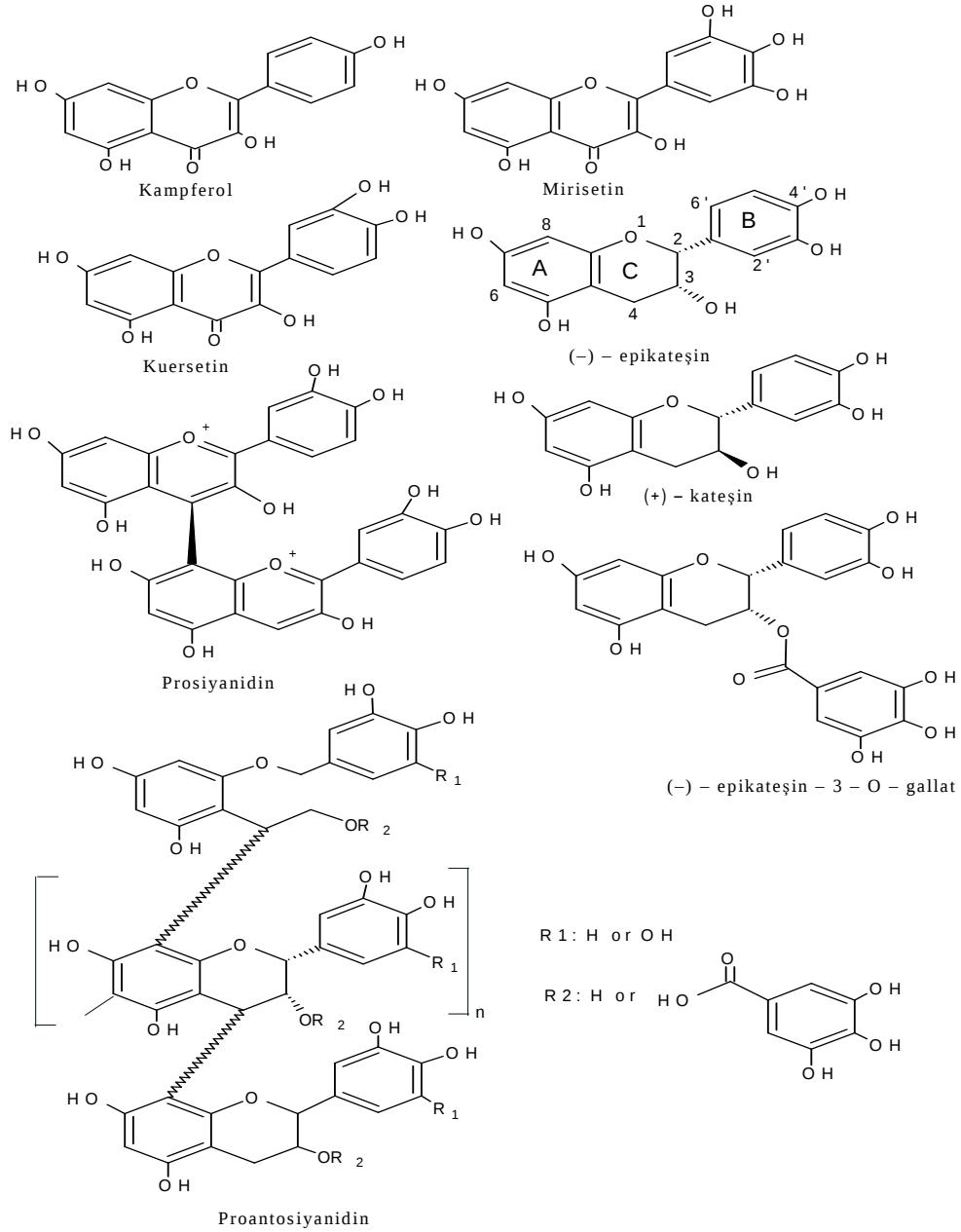


Şekil 2.4. Flavonoidin yapısı

En yaygın flavonoidler: (i) kampferol, kuersetin ve mirisetin içeren flavonoller, (ii) flavan-3-ol'ler ; ileri derecede polimerleşmiş oligomerlerin (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin-3-O-gallat monomerleri ile dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidinler ile (iii) antosiyaninler sayılabilir. Nonflavonoidler ise; tek bir aromatik halkadan oluşan fenoller ile kafeik asit ve *p*-kumarik asit gibi hidroksikinnamik asit türevleri ile gallik asit gibi hidroksibenzoik asit türevlerini kapsamaktadır. Nonflavonoidlerin diğer grubunun en iyi bilinen örneği; *trans*-resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroksisitolben) gibi sitilbenleri ve sitilben glikozidlerini kapsamaktadır. Ana iskeletleri; bir metilen köprüsü ile bağlanmış iki aromatik halkadan oluşmaktadır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. *Trans*-resveratrol ve *cis*-resveratrol



Şekil 2.6. Önemli bazı biyoaktif üzüm bileşenlerinin kimyasal yapıları

Halihazırda, üzümün meyvesinden ekstrakte edilebilen fenolik bileşenlerin; % 10 veya daha azı posasından, % 60-70'i çekirdeğinden, % 28-35'i ise kabuğundan elde edilmektedir. Üzüm çekirdeklerinin fenol içeriği, ağırlığın % 5 ila 8'ine tekabül etmektedir. Ayrıca, çekirdekler % 90 oranında zengin bir proantosiyanidin kaynağıdır. Bilinen, önemli bazı biyoaktif üzüm bileşenlerinin kimyasal yapıları yukarıda toplu olarak verilmiştir (Şekil 2.6.) (49).

2.2.7.2. Farmakolojik ve Biyolojik Etkileri

2.2.7.2.1. Antioksidan Etkileri

ÜÇÖ, serbest radikal temizleme aktivitesi ile antioksidan özellik taşımaktadır (53,54). Çekirdeğindeki prosiyanidinlerin, alfa-tokoferol üzerine koruyucu/ geri dönüştürücü etkisi, fosfatidilkolin lipozomlarında ve eritrositlerde ispatlanmıştır (55). Ayrıca prosiyanidinler serbest radikal temizlemenin yanısıra, oksidatif kaskadı tetikleyen ksantin-oksidaz enzimi aktivitesini de kuvvetli ve non-kompetitif olarak inhibe edebilmektedir (56). LDL kaynaklı lipid peroksidasyon ürünlerinin birikiminden düşük serum antioksidan düzeyleri sorumlu tutulmaktadır. Bir çalışmada; üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin düşük konsantrasyonlarda bile (2 mg/ L), çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (49). *İn-vitro* serbest radikal temizleme analiziyle yapılan bir başka çalışmada ise, ÜÇÖ'nün (50 mg/ L), serbest radikallere karşı C ve E vitaminlerinden daha iyi bir koruma sağladığı gösterilmiştir. Hatta diğer antioksidanlarla karşılaştırıldığında, ÜÇÖ'nün (100 mg/ kg) 12-O-tetradekanoil forbol-13-asetat (TPA)'nın neden olduğu oksidatif hasarlara karşı daha fazla koruma sağladığı da belirlenmiştir (57,58). Ayrıca, DNA oksidatif hasarlarına karşı önleyici hücresel ajanlar olarak, düşük konsantrasyonlardaki (10 µmol/ L, 25 µmol/ L) prosiyanidin B4, kateşin ve gallik asidin başarılı oldukları belirlenmiştir. Ancak bu maddelerin yüksek konsantrasyonlarda (150 µmol/ L) DNA hasarına yol açma olasılıkları mevcuttur. Benzer şekilde ÜÇÖ'nün; sıçan lökositlerinde, oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (49). Ayrıca, ÜÇÖ (75 mg/ kg) ve *Marjoram* esansiyel yağının (0,16 mL/ kg) birlikte verilmesinin; etanolün fertilité üzerindeki olumsuz etkileri ile, karaciğer ve beyin dokularında yaptığı tahribatı, oksidatif hasarı önlemek suretiyle azalttığı bildirilmiştir (59).

2.2.7.2.2. Hepatoprotektif Etkileri

Farelerde asetaminofenin hepatotoksik dozlarından (400-500 mg/ kg, ip.) önce ÜÇÖ (3-7 gün, 100 mg/ kg, po.) uygulamasının asetaminofene bağlı hepatik DNA hasarını, karaciğer hücrelerinin apoptotik ve nekrotik ölümünü anlamlı derecede azalttığı ve bcl-XL ekspresyonundaki asetaminofene bağlı değişiklikleri önlediği gösterilmiştir (60). Bir çalışmada ÜÇÖ'nün (günde 50 mg/ kg oral doz, 28 gün); sıçanlarda, safra kanalı bağlandıktan sonra karaciğeri oksidatif hasardan koruduğu bildirilmiştir (61). Bir başka çalışmada da, sıçanlarda; iskemi/ reperfüzyon hasarından önce ve reperfüzyon periyodu öncesinde tekrar 50 mg/ kg/ gün oral olarak, 15 gün ÜÇÖ verildiğinde iskemi/ reperfüzyon hasarını azalttığı gözlenmiştir (62). Sıçanlarda yapılmış olan, son çalışmalarda ise; sıçan karaciğerinde, üzüm çekirdeği proantosiyandinlerinin; antioksidan enzim aktivitelerini artırarak, metotreksat ve radyoterapiye bağlı oksidatif hasara karşı oldukça yüksek oranda koruma sağladığı gösterilmiştir (49,63,64).

2.2.8. Kekik (*Origanum onites L.*)

Origanum onites L. türü, *Lamiaceae* (*Labiatae*, *Ballıbabagiller*) familyasına mensup olup; bu familya dünyada 200 cins ve 3500 türe, ülkemizde ise 45 cins ve 546 türe sahiptir. Familya üyeleri, Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere; Avusturalya, Güneybatı Asya ve Güney Amerika'ya kadar yayılmıştır (65,66).

Origanum onites L. türü ise; Kuzey yarım kürede özellikle, Ege ve doğu Akdeniz'e özgü bir bitki olup, Türkiye, Sicilya ve Yunanistan'da da yetişmektedir. Anadolu'da ise; Ege ve Akdeniz bölgelerinde doğal olarak bulunmaktadır (67,68).

Origanum kelimesi; eski Yunanca kökenli bir kelimedir ve “dağ” anlamındaki “*Oros*” ile “süs” anlamındaki “*Ganos*” kelimelerinin birleşmesinden türemiş olup; “Dağın Süsü” anlamını taşımaktadır (69).

Avrupa'da “*Turkish Oregano*”, Anadolu'da ise; “İzmir Kekiği, Güvey Otu, Peynir Kekiği, Ak Kekik, Bilyalı Kekik ve Taş Kekik” yöresel adlarıyla bilinmektedir. Anadolu florasının doğal bir ürünü olmakla birlikte; kültür bitkisi olarak yetiştirilen ve ülkemizdeki tarım alanı 6300 dönüme ulaşan, tek ticari *Origanum* türüdür (67).

Kekik adı altında bilinen bir çok bitki türü olmasına rağmen; ülkemizde en yaygın olarak bulunan ve en fazla kullanılan *Origanum onites L.* türüdür. Eski Yunan, Roma ve Bizans'ta kullanılan önemli bir fitoterapötik ve bir tören bitkisidir. Günümüzde

bitkinin Anadolu’da kullanılan adlarından biri olan “Güvey Otu” adının; arkaik dönemlerde evlenen çiftlerin başına takılan “kekik tacından” geldiği bilinmektedir (70,71).

Morfolojik varyasyonlarının sayısı oldukça fazla olan *Origanum*’un; Türkiye’de bilinen 21 endemik türü mevcuttur. Ayrıca, bütün *Origanum* taksonlarının % 60’ının Türkiye’de bulunması; ülkemizin *Origanum* açısından bir gen merkezi olduğunun da kanıtıdır. Ayrıca, Türkiye; dünya kekik ticaretinde 2100 tonla ilk sırayı almaktadır. Türkiye’deki kekik ticaretinin % 80’ini oluşturan *Origanum onites* L.; Türkiye’de yetişen kekik türleri içerisinde en fazla ticareti yapılan tür olması açısından da büyük önem taşımaktadır (72).

2.2.8.1. Kimyasal Özellikleri

Labiatae familyasının diğer üyeleri gibi, *Origanum onites* L. türü de keskin kokulu ve aromatik bir bitki olup; kokusu, yapısındaki esansiyel yağlardan kaynaklanmaktadır (73). Esansiyel yağı içindeki kimyasal maddeler gruplarına göre şu şekilde sınıflandırılabilir (73,74):

1. $(C_5H_8)_n$ genel formülüne sahip hidrokarbonlar: Terpenler (Mirisen, Limonen, Terpinolen, Terpinen, Osimen, Pinen, Kampfen, Sabinen, gb.)
2. Oksijenli Terpen Türevleri: Terpen aldehit, alkol, keton ve esterleri (Linalool, Terpinol, Karveol, Mentol, Sitronellol, Borneol, Sabinol, Sitral, Menton, Karvon, İyonon, Piperiton gb.)
3. Benzenoid yapılı aromatik bileşikler: (Karvakrol, Timol, Anetol, Anizol, Öjenol gb.)
4. Azot ve Kükürt içeren bileşikler: (Skatol, İndol, Metil Antranilat gibi.)

Tanınmış bazı terpenlerin molekül yapıları aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.7.) (75).

Kekik suyu, esansiyel veya terpenik yağ adı verilen esansiyel yağlar; lignin ve selüloz polimerleri ile sudan oluşmaktadır (76).

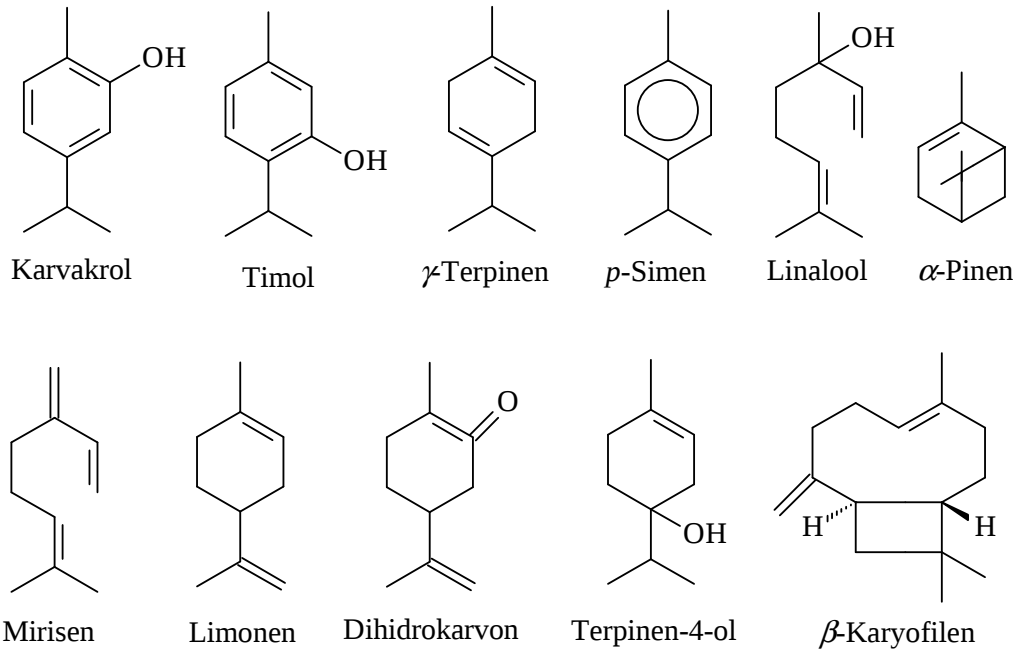
Origanum türlerinde bulunan esansiyel yağların % 1-8’i kurutulmuş yaprak, çiçek, tomurcuk ve dallarından elde edilmektedir (77,78).

Toprak üstü kısımları özellikle; soğuk algınlığı, baş ağrısı, mide rahatsızlıkları gibi durumlarda kullanılırken, esansiyel yağının da analjezik (ağrı kesici) etkisi gözlenmiştir.

Antiseptik, antibakteriyel, antispazmodik ve antioksidan etkileri ise; yüksek miktarda fenol içermesinden kaynaklanmaktadır (67).

Esansiyel yağların % 2-3'ü toprak üstü organlarından elde edilir. Esansiyel yağlar, karvakrol ve timol gibi fenolik maddeleri içermektedir. En eski antibiyotiklerden birisi olan timol tıpta; ekspektoran, antiseptik, antibakteriyel, antiastımatik ve antispazmodik olarak, esansiyel yağları ve terpenik bileşiklerinden dolayı da fungusit olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, timol diş dolgularında kullanılan bazı farmakolojik aktif maddelerin sentezinde, yiyeceklerin korunmasında ve antiseptik banyo sabunlarında kullanılmaktadır. Baharat olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan *Origanum onites*, ülkemizde en fazla ihraç edilen ürünlerden birisidir (79).

Ülkemizde farklı çeşitleri mevcut olan tüm *Origanum* taksonlarının ortak özelliği; esansiyel yağlardan zengin olmaları ve esansiyel yağ ana bileşiklerinin, kekiğe özgü kokusunu veren karvakrol ve/ veya timol olmasıdır (78,80).



Şekil 2.7. Bazı önemli terpenlerin molekül yapıları

Karvakrol (% 67–82); *Origanum onites* L. esansiyel yağı ile yapılan çalışmalarda, 13 örnekteki temel bileşen olarak bulunmuştur. Türkiye'nin güney bölgelerinde bulunan, Antalya ve Muğla gibi yörelerden elde edilen 4 örneğin de Linalool'ce (% 80–92)

zengin olduğu bulunmuştur. 3 örnekte ise; Karvakrol (% 36-66) ve Linalool (% 15-52) birlikte baskın bileşenler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Karvakrol (% 57) ve Timol (% 12) ise 1 örnekte temel bileşen olarak belirlenmiştir (Tablo 2.2.) (72).

Tablo 2.2. Türkiye’de yetişen *Origanum onites* esansiyel yağ kompozisyonu

Tipi	Yağ Verimi (%)	Karvakrol (%)	Timol (%)	γ terpinen (%)	<i>p</i> -simen (%)	Linalool (%)
Karvakrol-tip* (13 örnek)	1.1-4.7	66.5-81.9	0.2-1.9	1.6-8.7	3.0-10,9	0.04-1.9
Linalool-tip (4 örnek)	2.6-4.0	0.3-13.4	0.0-0.05	0.03-0.1	0.01-0,3	79.9-91.9**
Karma-tip (3 örnek)	2.5-2.8	36.3-66.0	0.04-3.6	1.3-4.1	1.5-4.9	14.8-51.8
* Diğer (1 örnek)	2.4	57.4	11.6	5.2	8.1	0.1

**** Antalya, Muğla**

Tadı, kokusu, rengi ve görünümü kendine özgü olan esansiyel yağlarda; organik asitler, alkoller, fenoller ve ketonlar ile terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri de mevcuttur (81). Karvakrol oranı, bitkinin çiçek ve salkımlarında % 72,8, bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında % 63,89 ve yapraklarında % 60,17 oranında bulunmaktadır. Çiçek ve salkımlardaki timol oranı ise; % 0,60, yapraklarda % 4,64’tür (76).

Türkiye’de yapılan çalışmalar, *Lamiaceae* familyasının fenolik monoterpenlerce zengin olup; kekiğin biyolojik aktivitelerinin çoğunun esansiyel kekik yağının ana bileşenlerinden olan karvakrol ve timole bağlı olduğunu göstermiştir. Karvakrol; antioksidan, antispazmodik, antitümoral, antimikrobiyal, antifungal, diüretik ve analjezik özelliklere sahip bir monoterpendir (82). *Origanum* türlerinde bulunan ve kafeik asit türevlerinden biri olan rozmarinik asit de antioksidan ve antiviral etkilidir (83,84).

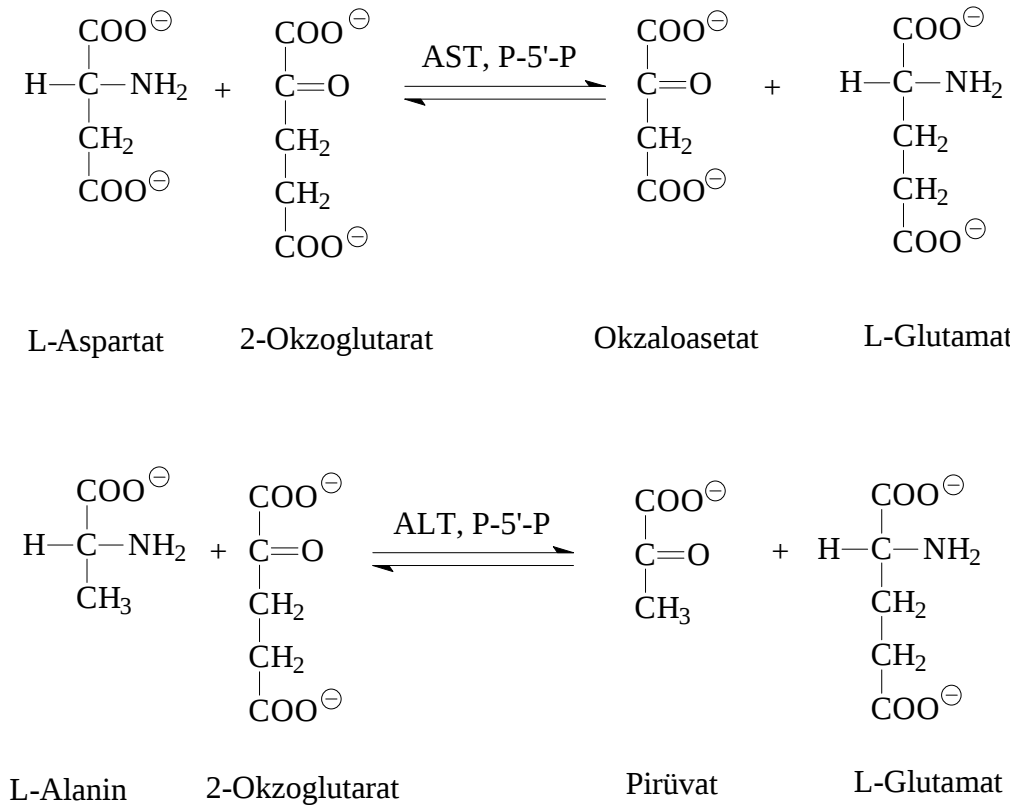
2.2.8.2. Antioksidan ve Hepatoprotektif Etkileri

Lamiaceae familyasının türleri, sahip oldukları fenolik bileşiklerinden dolayı antioksidan özellik göstermektedirler. *Origanum* ekstraktlarında; karvakrol ve rozmarinik asit gibi serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan fenolik bileşikler bulunmaktadır (15).

Jimenez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; karvakrolün, karaciğer tahribatının indekslerinden biri olan transaminaz düzeyini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (85). Esansiyel kekik yağı, bir çok karaciğer koruyucu işlevlerinin yanı sıra; orta çağda, “karaciğer” hastalıkları ve “antitümör” etkinliği nedeniyle kullanılmıştır (16). Fransa’da yapılan başka bir çalışmada ise; *Origanum glaucum* esansiyel yağının, koleretik etkisi gösterilmiştir (86). *In-vitro* şartlarda yapılan glutatyon-S-transferaz deneylerinde; esansiyel yağın aktif bir bileşeni olan karvonun; kanserojen etkili kimyasal ajanların etkisini önlediği gösterilmiştir (87). Ayrıca, karvonun kan-beyin bariyerini geçebildiği de bilinmektedir (88). Serbest radikal temizleme ve tiyobarbitürik asit reaktifleri ölçüm yöntemi kullanılarak *Origanum vulgare* L. ile yapılan bir çalışmada; *Origanum* esansiyel yağının, hidroperoksit oluşumunu inhibe ederek karbonil (CHO) gruplarına karşı çok güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, sözkonusu antioksidan etkinin *Origanum* esansiyel yağının karvakrol ve timol içeriğinden kaynaklandığı belirtilmiştir (89). Yine, *Origanum Onites* L. gibi *Lamiaceae* familyasına mensup ve Türkiye’ye özgü endemik bir tür olan *Thymus argaeus* L.’nin; antimikrobiyal etkisinin yanı sıra güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (90).

2.2.9. Aminotransferazlar

Amino asitler ile 2-okzo-asitlerin birbirine çevrilmesini, amino gruplarının transferi yolu ile gerçekleştiren enzimlerdir. Amino grubu transferlerinin gerçekleştirildiği tüm tepkimelerde 2-okzoglutarat/ L-glutamat çifti, amino grubu alıcısı ve vericisi olarak kullanılır. Her enzimin özgüllüğü, amino grubu vericisi olarak kullanılan özel amino asidinden kaynaklanır. Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) sırasıyla, belirtilen tepkimeleri katalizler (Şekil 2.8.). AST (EC 2.6.1.1) ve ALT (EC. 2.6.1.2) ile katalizlenen bu geri dönüşümlü reaksiyonlarda denge, sırasıyla aspartat ve alanin oluşumu yönündedir. Piridoksal-5'-fosfat (P-5'-P) ve amino analogu, piridoksamin-5-fosfat, amino grubu transferi reaksiyonlarında koenzim olarak görev yaparlar. Apoenzime bağlanan P-5'-P, prostetik grup olarak görev yapar. P-5'-P bağlı apoenzim ilk substrattan (aspartat veya alanin) amino grubunu alır ve ilk tepkime ürünü olan enzime bağlı piridoksamin-5'-fosfat ile oksaloasetat veya pirüvat oluşturur. Amino grubu bağlı bulunan koenzim amino grubunu ikinci substrata (2-okzoglutarat) aktararak ikinci ürünün (glutamat) oluşmasını sağlar. Geri elde edilen P-5'-P yeniden kullanılır.



Şekil 2.8. AST ve ALT'nin katalizlediği tepkimeler

Hem holoaminotransferazlar hem de koenzim taşımayan apoenzimler serumda bulunabilir. Bu koşullarda eklenen P-5'-P, enzim yapısına katıldığı için aminotransferaz aktivitesi belirgin olarak artar. Sıfır ile üç veya dört kat arasında değişen bu artış, normal serumda AST aktivitesinde yaklaşık % 50, ALT aktivitesinde ise % 20 artışa yol açar. Karaciğerin bütünlüğünü etkileyen hastalıklarda serum AST ve ALT düzeylerinin arttığı görülmeye karşın, ALT karaciğere daha özgün bir enzimdir. Parankimal karaciğer hastalıkları dışında serum ALT aktivitesinde artış, nadiren gözlenir. Ayrıca ALT aktivitesi AST aktivitesinden daha uzun süre yüksek kalır (91).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Şubat 2009 ile Kasım 2009 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)’nden temin edilen sıçanlarla yapılan deneysel çalışmalar sonucunda alınan karaciğer doku örneklerinde; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında oksidatif stres parametreleri, serum örneklerinde ise; Gülser–Dr. Mustafa GÜNDOĞDU Merkez Laboratuvarında aminotransferaz düzeyleri tayin edildi. EÜTF Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında da sıçan karaciğer dokularının histopatolojik olarak değerlendirmeleri yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, Merck ve Sigma marka analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı. Çalışma sırasında soğutmalı santrifüj (Sigma 3k 30), otoanalizör (Olympus AU 2700), derin dondurucu (BOSCH, PHILCO), spektrofotometre (Shimadzu uv-1601), pH-metre (HANNA HI 9321), tridistile su cihazı (Barnstead), etüv (Dedeoğlu), su banyosu (Kotterman), vorteks (Elektromag), manyetik karıştırıcı (nüve), kronometre, otomatik (Socorex ve Gilson) ve cam pipetler, cam tüpler, beher, mezür ve balon jojeler kullanıldı.

Cam malzemeler; % 20'lik nitrik asit çözeltisi içerisinde, 24 saat bekletildikten sonra 3 defa distile su ile yıkanarak deiyonize edildi (92). Biyokimyasal ölçümler için gerekli çözeltiler ve tamponlar, tridistile su ile hazırlandı.

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya 96 adet, 230- 310 gr ağırlığında erkek Wistar-albino cinsi sıçan alındı. Sıçanlar, havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan odalarda ve her birinde dört sıçanın bulunduğu özel kafeslerde tutuldular. Çalışmaya başlamadan önceki yedi gün süresince, sıçanlar oda sıcaklığında (22 ± 2 °C), 12 saat doğal aydınlık-karanlık periyodunda barındırıldılar. Besleme işlemi için; ticari standart pellet yem ve gerektiği kadar çeşme suyu verildi. Sular her gün değiştirildi ve kafes temizliği gün aşırı yapıldı. Standart yedi günlük alışma periyodundan sonra, çalışmaya başlamadan 12 saat önce benzer metabolik durumu sağlamak için su kısıtlaması yapmaksızın yiyecek kısıtlaması yapıldı.

3.1.2. Üzüm Çekirdeği Özütü (ÜÇÖ)' nün Kaynağı-Hazırlanışı

Şarap yapımında kullanılan ve Türkiye'de yetiştirilen en yaygın olgunlaşmış üzüm (*Vitis vinifera L.*) kültürü olarak bilinen, Tokat yöresine özgü Öküzgözü kırmızı üzüm kültürü kullanılarak hazırlandı. Hasat sonrası, zedelenmemiş sağlıklı üzüm taneleri salkımlardan kesildi. Sonra, uygun görülen taneler el yordamıyla serildi. Çekirdekler ile çekirdeği çıkarılmış ve suyu alınmış taneler 70°C'de, 72 saat boyunca serilerek kurutuldu. Kurutulmuş çekirdekler; kaliteli bir granül kütle elde edebilmek amacıyla öğütücüye yerleştirildi. Çekirdek granülat (100 g) alınarak; Soxhlet ekstraktöründe (Merck, Darmstadt, Germany) yağ içeren bileşenlerinden arındırılması amacıyla, 60°C' de 6 saat boyunca, petrol eteri ile ekstrakte edildi. Yağ içeriğinden arındırılmış olan çekirdek granülatı, 8 saat boyunca 200 mL etanolde yeniden ekstrakte edildi. Daha sonra ekstrakt, ham ekstraktı elde edebilmek amacıyla, kendi eksenini etrafında dönen bir evaporatörde (Rotavator Evaporator R 200, Buchi, Switzerland), 40°C'nin altında vakumlanarak konsantre edildi ve liyofilizasyon işlemine (Labconco Freezone 2.5, Missouri, USA) tabi tutulduktan sonra kullanıma kadar 4°C'de koyu renkli bir şişede muhafaza edildi (93). Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile, çekirdek ekstraktında bulunan total fenolik bileşen konsantrasyonu ölçüldü (94). Ölçümler; üç aşamalı olarak uygulandı ve hesaplamalar gallik asit ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak yapıldı. Total fenolik konsantrasyonlar; ekstraktın gramı başına düşen gallik asitin

miliekivalent gramı cinsinden olmak suretiyle, gallik asit ekivalansı olarak ifade edildi ve total fenoliklerin içeriği; çekirdek ekstraktının gramı başına 573.5 ± 6.80 mg gallik asit ekivalantı olarak bulundu (95,96).

3.1.3. Esansiyel Kekik Yağı (EKY)'nın Kaynağı-Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan kekik (*Origanum onites*) örnekleri, İzmir'den toplandı. Yabani *Origanum* (*Origanum onites* L.) esansiyel yağı Clevenger hidrodistilasyon yöntemi ile üretildi (90). Bitki materyalleri (500 g); küçük parçalara ayrılarak, içerisinde iki kere distile edilmiş, 2 L distile su bulunan distilasyon aparatına yerleştirilerek, 3 saat boyunca hidrodistilasyon işlemine tabii tutuldu. Esansiyel yağ; sodyum sülfat anhidrit yardımıyla saflaştırılarak, analiz işlemine kadar $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı. Çalışmanın bir önceki aşamasında gas chromatography/ mass spectrometry (GC/ MS)/ quadropole dedektörü (Shimadzu QP 5050 System, Shimadzu, Duisburg, Germany) yardımıyla ölçülmüş olan esansiyel yağ kompozisyonunda; mirisen ($\% 0.47 \pm 0.01$), α -terpinen ($\% 0.61 \pm 0.08$), γ -terpinen ($\% 2.61 \pm 0.02$), *p*-simen ($\% 2.93 \pm 0.02$), linalool ($\% 11.85 \pm 0.10$), β -caryofilen ($\% 0.96 \pm 0.08$), terpinen-4-ol ($\% 0.92 \pm 0.04$), timol ($\% 9.34 \pm 0.17$) ve karvakrol ($\% 70.27 \pm 0.17$) bulundu. Yabani *Origanum* (*Origanum onites* L.) esansiyel yağının, yüksek oranda karvakrol, linalool ve timol içeriği ile karakterize olduğu sonucuna varıldı (97).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması, ÜÇÖ ve EKY ile Sisplatinin Uygulanması

Deneysel çalışma 96 Wistar-albino erkek sıçandan oluştu ve rastgele, her biri 12 hayvandan oluşan 8 gruba bölünerek; 10 gün süreyle takip edildi:

Kontrol grubu: Periton içine serum fizyolojik enjekte edilerek, gavaj yoluyla distile su verildi.

ÜÇÖ grubu: 100 mg/ kg / gün, gavaj yoluyla verildi.

EKY grubu: 1 g/ kg/ gün, periton içine enjekte edildi.

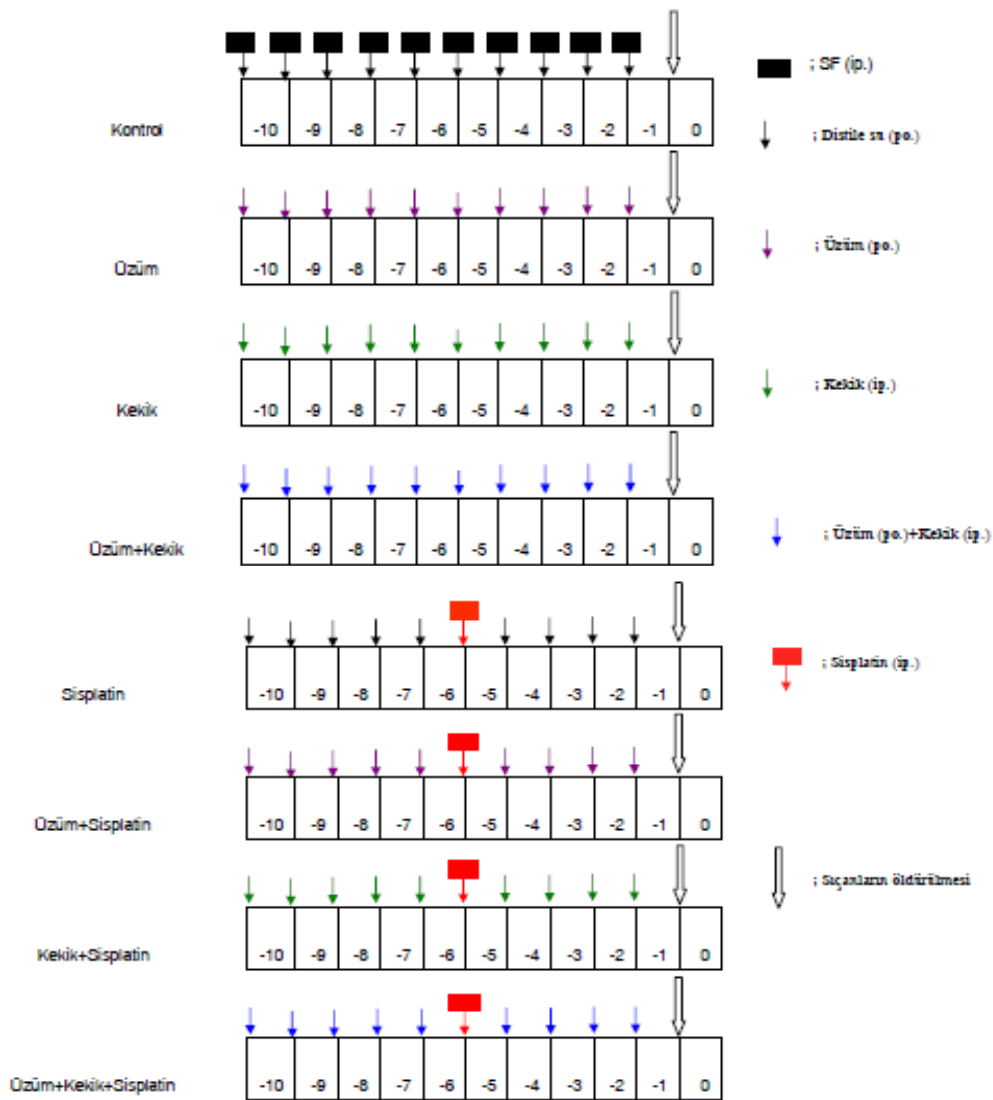
Sisplatin grubu: 7 mg/ kg, 6. gün, periton içine enjekte edildi.

ÜÇÖ + Sisplatin grubu: ÜÇÖ 100 mg/ kg/ gün, gavaj yoluyla verildi ve sisplatin 7 mg/ kg, 6. gün, periton içine enjekte edildi.

EKY + Sisplatin grubu: EKY 1 mg/ kg/ gün, periton içine enjekte edildi ve sisplatin 7 mg/ kg, 6.gün, periton içine enjekte edildi.

ÜÇÖ + EKY + Sisplatin grubu: ÜÇÖ 100 mg/ kg/ gün, gavaj yoluyla verildi, EKY 1 mg/ kg/ gün, periton içine enjekte edildi ve sisplatin 7 mg/ kg, 6. gün, periton içine enjekte edildi.

ÜÇÖ + EKY grubu: ÜÇÖ 100 mg/ kg/ gün, gavaj yoluyla verildi ve EKY 1 mg/ kg/ gün, periton içine enjekte edildi. Çalışmanın 11. günü tüm sıçanlar, genel anestezi altında 50 mg/ kg (ip.) ketamin uygulaması ile öldürüldü (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çalışmanın şematik olarak ifade edilmesi

ÜÇÖ ve EKY solüsyonu ve eşit miktarda plasebo (oral distile su), çalışma süresince her gün aynı saatte, oral yolla, 3 inç-16 gauge gavaj tüpü ile verildi. Etken maddelerin dozu ve uygulama şekilleri deneysel çalışma prosedürleri esas alınarak belirlendi.

Karaciğer fonksiyonlarının göstergesi olan serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerini ölçebilmek için sıçanlar öldürülmeden önce intrakardiyak, 4-5 cc kan örneği alındı. Alınan kan numuneleri 986 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar, çalışma gününe kadar -80°C 'de saklandı. Sıçanlar öldürüldükten hemen sonra, oksidatif stres belirteci malondialdehit (MDA) ile antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri çalışılması için karaciğer dokuları çıkarıldı. Çıkarılan organlar; histopatolojik inceleme için, buzlu izotonik salin solüsyonunda yıkandıktan sonra formalin içine konuldu.

3.2.2. Karaciğer Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Karaciğerden doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler buz içerisinde ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yürütüldü. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör (Ultra-Turrax T25, IKA; Werke 24.000 rpm.; Germany) ile yapıldı.

Karaciğer dokuları, 0.05M Fostat tamponu ($\text{pH} = 7,4$) ile 1/ 10 (w/ v) oranında dilüe edildikten sonra homojenize edildi. Bu şekilde hazırlanan homojenat, 19090 g'de 30 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant MDA düzeyi ile SOD ve GSH-Px aktivitelerinin ölçümünde kullanılmak üzere alikotlar halinde, -80°C 'de dondurularak saklandı (98).

3.2.3. Total Protein Tayini

Total protein miktarının tayin edilmesinde Lowry yöntemi kullanıldı (99).

Reaktifler

– A çözeltisi (% 2'lik $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01 N NaOH içinde):

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.0 g
NaOH	0,4 g

Tridistile deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlanarak renkli şişede saklandı.

– B₁ çözeltisi (% 1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g

Tridistile deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı.

– B₂ çözeltisi (% 2'lik Na-K tartarat.4H₂O):

Na-K-tartarat.4H₂O 1 g

Tridistile deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı.

– C çözeltisi (günlük hazırlandı):

100 hacim A

1 hacim B₁

1 hacim B₂

– BSA standardı:

BSA 250 mg

Tridistile deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

– Folin–Ciocalteu–Fenol reaktifi:

Sodyum tungustat 100 g

Sodyum molibdat 25 g

Tridistile deiyonize su 700 mL

Konsantre HCl 100 mL

% 85'lik fosforik asit 50 mL

Hazırlanan bu çözelti, cam balona kondu. Geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldıktan sonra;

– LiSO₄ 150 g

– Tridistile deiyonize su 50 mL

– Brom 1-2 damla

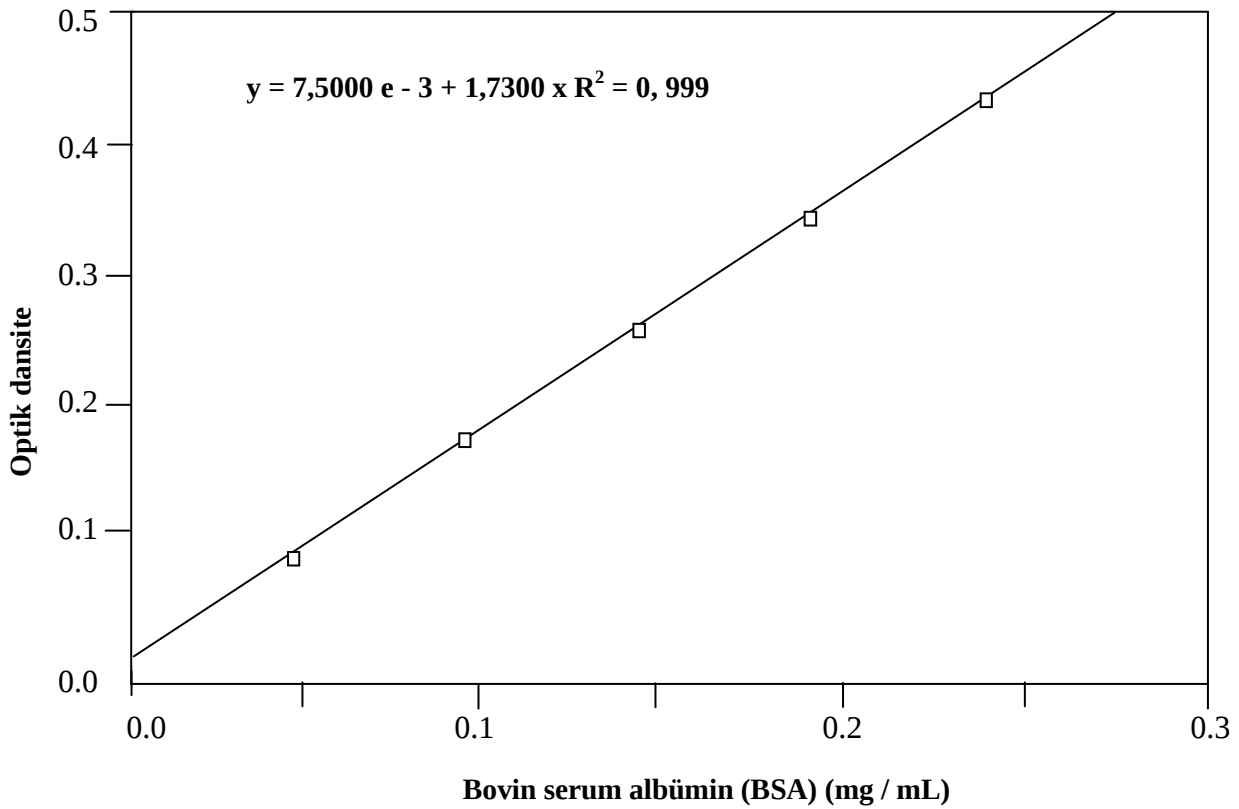
İlave edilerek 1 saat daha kaynatıldı.

Bromun fazlasını uzaklaştırmak için su ile 1000 mL'ye tamamlanarak süzüldü. Rengi altın sarısı olan solüsyon buz dolabında saklandı. Asit cinsinden 2 N olan solüsyon, 1/ 1 oranında tridistile su ile dilüe edilerek kullanıldı.

Çalışma

Deney tüplerine 0.3 mL doku ihtiva eden elüat ve 3.0 mL "C" çözeltisinden pipetlendi. Vorteksle karıştırılıp, 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra tüplerin üzerine 0.3 mL dilüe Folin-Ciocalteu reaktifinden ilave edilip hemen vorteksle karıştırıldı. Tüpler oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 750 nm'deki absorbanları, tridistile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı okundu.

Değerlendirme 0.05; 0.1; 0.15; 0.20; 0.25 mg/ mL konsantrasyonlarında hazırlanan BSA standart eğrisi üzerinden yapıldı (Şekil 3.2.). Sonuçlar mg / mL olarak verildi.



Şekil 3.2. Total protein standart eğrisi

3.2.4. Doku MDA Tayini

Karaciğer dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark. (100) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

Reaktifler

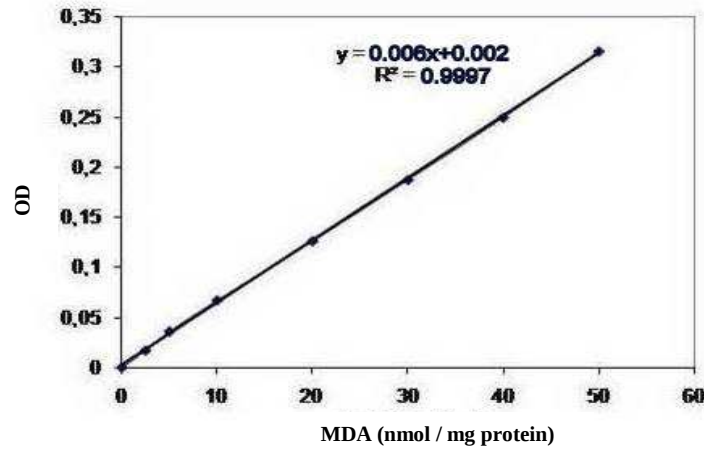
1. % 8.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. % 20 Asetik asit, pH= 3.5
3. % 0.8 TBA
4. n-Butanol/ Piridin karışımı (15:1; v/ v)
5. 5.848 M MDA (stok standart)

Çalışma

Karaciğer doku homojenatının (1/ 10 w/ v) santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant MDA ölçümünde kullanıldı. Süpernatantlardan 0.1 mL alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0.1 mL SDS, 0.75 mL asetik asit, 0.75 mL TBA ve 0.3 mL distile su eklenerek iyice karıştırıldı. Ağzıları sıkıca kapatılan tüpler, kaynar su banyosunda 60 dk kaynatıldı. Musluk suyu altında soğutulan tüplere 0.5 mL distile su ve 2.5 mL n-butanol/ piridin karışımı ilave edilerek vorteksle iyice karıştırıldı. Ekstraksiyonu takiben 4⁰C’de, 1753 g’de 15 dk santrifüj edilen tüplerin üst kısmında oluşan pembe renkli organik fazın absorbansı (A), 532 nm’de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri üzerinden yapıldı.

3.2.5. Standart Serinin Hazırlanması

Stok MDA (5.848 M) çözeltisinde 100 nmol/ mL konsantrasyonunda ara stok hazırlandı. Ara stok standarttan, deney ortamında (2.0 mL) 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0 nmol MDA/ mL olacak şekilde sırasıyla; 5; 10; 20; 30; 40; 60 nmol/ mL konsantrasyonlarında MDA çalışma standartları hazırlandı. Standart serinin her birinden 0.1 mL alınarak numune gibi çalışıldı ve standart eğri çizildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. MDA standart grafiği

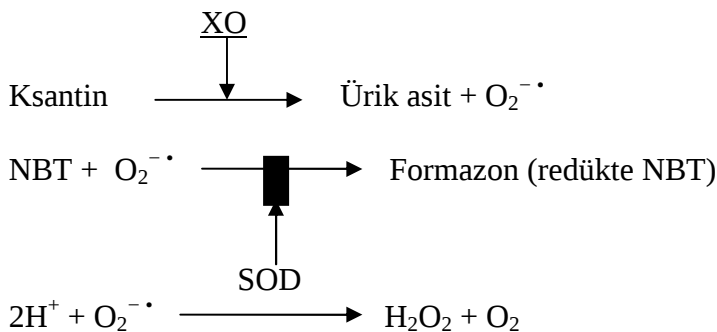
Karaciğer doku süpernatantlarında Lowry ve ark.'nın yöntemine göre; karaciğer doku protein miktarları tayin edildi ve standart eğriden bulunan doku MDA düzeyleri, miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein) (99).

3.2.6. SOD Aktivitesi Tayini

Çalışmaya alınan sıçanların karaciğer dokularındaki süperoksit dismutaz aktivitesi tayininde, Sun ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (101).

Prensip: Ksantin oksidaz (XO) ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot -}$), nitroblue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturması prensibine dayanmaktadır. $O_2^{\cdot -}$ 'un H_2O_2 'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO tepkimeleri ile üretilen $O_2^{\cdot -}$ sürekli tüketileceğinden, NBT ile tepkimeye giren $O_2^{\cdot -}$ miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir.

Özetle SOD aktivitesi; XO'nın katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT redüksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



Reaktifler

1. 0.01 M Fosfat tamponu, pH= 7.0
2. 0.3 mM Ksantin
3. 150 μ M NBT
4. 0.4 M Sodyum karbonat
5. 0.6 mM EDTA
6. 1 g/ L BSA
7. 0.8 mM CuCl_2
8. 2 M Amonyum sülfat
9. 167 Ü/ L (Ünite/ Litre) XO (Sigma X-1875) (2 M soğuk amonyum sülfat içinde hazırlanır)
10. 0.6 mg/ mL SOD (Sigma S-2515) (stok standart)

Karaciğer doku homojenatı (1/ 10 w/ v)'nın; 19090 g'de 30 dakika santrifülenmesiyle elde edilen süpernatanın 0.05 mL'si, 0.01 M Fosfat tamponu (pH= 7.0) ile 1/ 10 oranında dilüe edilerek, SOD ölçümünde kullanıldı.

Çalışma

SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2.45 mL olacak şekilde, aşağıdaki konsantrasyonlarda bir deney karışımı hazırlandı:

0,3 mM Ksantin	1,0 mL
150 μ M NBT	0,5 mL
0,4M Sodyum karbonat	0,3 mL
0,6 mM EDTA	0,5 mL
1g/L BSA	0,15 mL
Deney karışımı	2,45 mL

Deney karışımı pipetlenen numune tüplerinin üzerine karaciğer doku homojenatlarından elde edilen 0,5 mL dilüe süpernatın ve deney karışımı içeren kontrol tüpüne 0,5 mL 0.01 M Fosfat tamponu (pH= 7,0) ilave edildi. Deney tüpleri 25°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, her birinin üzerine eşit zaman aralıkları ile, 0.05 mL 167 Ü/ L XO

eklenerek tepkime başlatıldı. Tüpler, 25 °C'de 20 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, yine eşit zaman aralıkları ile tüplere 1 mL 0,8 mM CuCl₂ ilavesi ile tepkime durduruldu. Numune ve kontrol tüplerinde; formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı spektrometrede okundu. SOD içermeyen kontrol tüpünde, maksimum formazon oluşumu (A veya optik dansite: 0.250) gözlemlendi.

3.2.7. Standart Serinin Hazırlanması

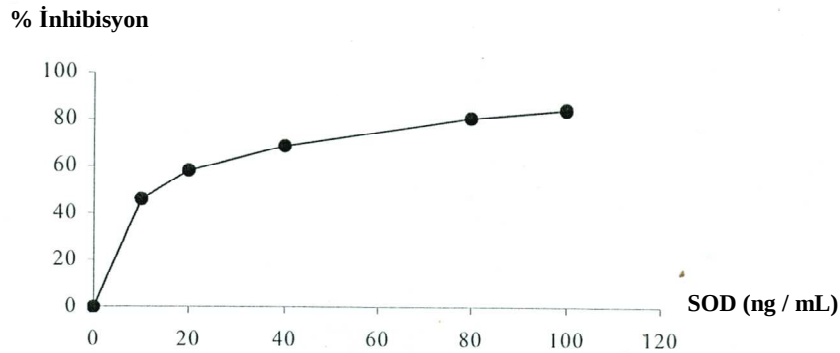
SOD (3300 Ü/ mg solid/ mg protein), 0,6 mg/ mL konsantrasyonda olacak şekilde, distile su ile çözüldü. Bu stok standart 0.01 M Fosfat tamponu ile dilüe edilerek, deney ortamında sırasıyla 10; 20; 40; 80; 100 ng/ mL konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlandı ve numune gibi çalışıldı.

Hesaplama

Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Kontrol A} - \text{Numune A})}{\text{Kontrol A}} \times 100$$

Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği çizildi ve hiperbolik bir eğri elde edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. SOD inhibisyon grafiği

Ayrıca % inhibisyon değerlerine karşı, SOD konsantrasyonlarının logaritmik değerleri kullanılarak, doğrusal bir grafik elde edildi (Şekil 3.5.).

Reaktifler

1. 0.05 M Fosfat tamponu, pH= 7.0 (5 mM EDTA içerir)
2. 8.4 nM NADPH
3. 0.15 M GSH
4. 112.5 mM NaN₃
5. 100 Ü/ mg protein/ mL GSSG-Rd (Sigma, G-1762)
6. 2.2 mM H₂O₂ (taze hazırlanır)
7. Konsantre Drabkins çözeltisi (Aynı hacimde iki kat konsantrasyonda hazırlanır)

Çalışma

GSH-Px aktivitesi tayin edilecek her numune için aşağıda verilen konsantrasyonlarda istenen deney karışımı hazırlandı:

Fosfat tamponu	2.63 mL
8.4 mM NADPH	0.10 mL
100 Ü/mL GSSG-Rd	0.01 mL
112.5 mM NaN ₃	0.01 mL
<u>0.15 M GSH</u>	<u>0.10 mL</u>
Deney karışımı	2.85 mL

Pipetleme hatalarını azaltmak amacıyla; test sayısına göre, reaktiflerin önceden karşılaştırılmasıyla elde edilen deney karışım havuzu, 2.85 mL hacimde, deney tüplerine pipetlendi.

Hazırlanan deney karışımını içeren tüplerin üzerine 0.05 mL numune (lizat – Drabkins karışımı ya da doku süpernatanı) ilave edildi ve tüpler 25 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Kuartz küvetlere aktarılan inkübasyon karışımları üzerine 0,1 mL, 2,2 M H₂O₂ pipetlenerek tepkime başlatıldı ve UV-spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı, OD’deki düşüş 4 dakika süre ile izlendi. Ayrıca GSH’nun nonenzimatik oksidasyonunu tayin etmek için, numune yerine distile su kullanılarak (kontrol) çalışma tekrarlandı.

Hesaplama

Her numune ve kontrol tüpü için 2. ve 4. dakika A (absorbans veya optik dansite) değerleri kullanılarak, dakikadaki absorbans değişimi ($\Delta A/ dk$) değerleri hesaplandı.

Daha sonra numune $\Delta A/ dk$ değerlerinden kontrol değerleri çıkarılarak, net $\Delta A/ dk$ değerleri bulundu.

Bir ünite GSH-Px, standart deney şartlarında 1.0 mikromol (μmol) NADPH'ın oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. ($\ddot{U}/ L = \mu\text{mol NADPH}/ dk/ L$) (102).

NADPH'ın molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak doku örneklerinin net $\Delta A/ dk$ değerlerinden, ünite birimine geçildi:

$$\ddot{U} / mL = \frac{\Delta A / dk}{\epsilon} \times \frac{\text{Total hacim (mL)}}{\text{Num. hacmi (mL)}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \times \frac{1}{1000 \text{ mL}}$$

$$\ddot{U} / mL = \frac{\Delta A / dk}{6.22 \times 10^3} \times \frac{3,0}{0,05} \times \frac{10^6}{1000}$$

$$\ddot{U} / mL = \Delta A / dk \times 9.646$$

GSH-Px ünite ($\ddot{U}/ mL$) değerleri, yöntemin uygulanması sırasında yapılan işlemlere karşılık gelen dilüsyon faktörleriyle çarpılarak, doku GSH-Px aktiviteleri bulundu.

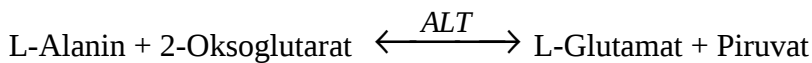
Karaciğer dokusu GSH-Px aktivitesi, gram protein başına ($\ddot{U}/ g \text{ protein}$) hesaplanarak, spesifik aktivite cinsinden verildi.

3.2.9. Aminotransferaz Ölçüm Yöntemleri

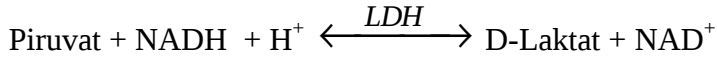
Karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için; sıçanlardan alınan serum örneklerinde Olympus AU 2700, Japan marka otoanalizörde, Olympus Diagnostics'ten temin edilen kitler ile IFCC (International Federation of Clinical Chemistry)'nin tavsiye ettiği coupled-enzyme tekniği kullanılarak alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri tayin edildi.

3.2.9.1. ALT Ölçüm Yöntemi

L-alaninden 2-oksooglutarat'a bir amino grubunun aktarılmasıyla piruvat ve L glutamat oluşur. Bu tepkimeyi ALT katalizler:



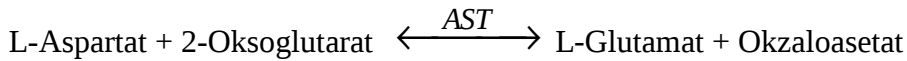
Tepkime sonucu oluşan piruvat, laktat dehidrogenazın (LDH) etkisi ile laktata indirgenir.



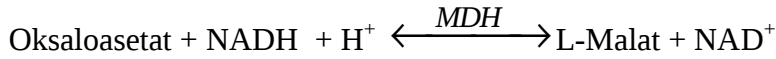
Prensip: Tepkime sırasında NADH oksitlenir ve NAD^+ oluşur. 340 nm dalga boyunda NADH miktarının birim zamandaki azalması belirlenir. Birim zamanda absorbansta gözlenen değişiklikler ($\Delta A/ dk$), mikromol cinsinden okside olan NADH ve mikromol cinsinden değişime uğrayan substrat miktarında, internasyonal ünite cinsinden dakikada meydana gelen değişiklik ile orantılıdır. Sonuçlar; $\ddot{U}/ L$ olarak hesaplandı.

3.2.9.2. AST Ölçüm Yöntemi

L-aspartattan 2-oksooglutarat'a bir amino grubunun aktarılmasıyla okzaloasetat ve L glutamat oluşur. Bu tepkimeyi AST katalizler:



Tepkime sonucu oluşan okzaloasetat, malat dehidrogenazın (MDH) etkisi ile malata indirgenir.



Prensip: Tepkime sırasında NADH oksitlenir ve NAD^+ oluşur. 340 nm dalga boyunda NADH miktarının birim zamandaki azalması belirlenir. Birim zamanda absorbansta gözlenen değişiklikler ($\Delta A/ dk$), mikromol cinsinden okside olan NADH ve mikromol cinsinden değişime uğrayan substrat miktarında, internasyonal ünite cinsinden dakikada meydana gelen değişiklik ile orantılıdır. Sonuçlar; $\ddot{U}/ L$ olarak hesaplandı (91).

3.3. KULLANILAN YÖNTEMLERİN TEKRARLANABİLİRLİĞİ (CV DEĞERLERİ)

Çalıştığımız yöntemlerin güvenilirliğini test edebilmek amacıyla, çalışılan serum ve dokulardan; 8 deney grubunun her birinden alınmak üzere, 3-4'er tane gelişi güzel serum örnekleri seçilerek bir serum havuzu hazırlandı.

Hazırlanan bu serum havuzundan, çalışılan her bir yöntem için en az 10'ar defa (x10); sıçanların karaciğer dokusu MDA düzeyleri, SOD ve GSH-Px aktivite değerleri ile

serum ALT ve AST düzeyleri ölçüm yöntemlerinin her biri için ayrı ayrı çalışılarak CV (değişim katsayısı) değerleri hesaplandı.

Çalışılan yöntemlerin CV değerleri " $CV = \frac{SS}{\bar{x}} \times 100$ " bağıntısı kullanılarak hesaplandı.

Çalışılan her bir yöntem için CV değerleri: % 0-10 normal kabul edildi.

Çalışmamızda kullanılan protein tayin yönteminin tekrarlanabilirliğini ölçmek için; doku fraksiyonlarından oluşturulan havuz 1/ 50 oranında dilüe edildikten sonra 10 defa protein ölçümü yapıldı. Sonuçlar grafikten değerlendirildi ve dilüsyon faktörü ile çarpıldı. CV değeri % 2.68 olarak bulundu (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Kullanılan yöntemlerin CV değerleri

CV Değerleri	$\bar{x} \pm SS$	CV (%)	n
Total protein (mg / mL) CV değeri	4.33 $\pm$ 0.116	2,68	10
MDA (nmol / mg protein) CV değeri	3.46 $\pm$ 0.133	3,84	
SOD (Ü / mg protein) CV değeri	3.29 $\pm$ 0.119	3,62	
GSH-Px (Ü / g protein) CV değeri	4.51 $\pm$ 0.113	2,51	
ALT (Ü / L) CV değeri	3.82 $\pm$ 0.115	3,01	
AST (Ü / L) CV değeri	3.55 $\pm$ 0.121	3,41	

n: Deney sayısı, $\bar{x} \pm SS$: Ortalama $\pm$ standart sapma, CV: Değişim katsayısı

Çalışılan her bir yöntem için CV değerleri % 0-10 arasında hesaplandığından dolayı kullandığımız yöntemlerin güvenilir olduğu sonucuna varıldı.

3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) ve ortanca (25'inci persentil-75'inci persentil) olarak ifade edildi. Çalışma gruplarının karaciğer doku homojenatı ve serum MDA, SOD, GSH-Px, ALT ve AST aktiviteleri ile karaciğer doku homojenatı aktivite değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testlerinden (Post Hoc Tests) Tukey testi kullanıldı. Çalışma gruplarında histopatolojik skorların ortancalarının karşılaştırılmasında; Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi (çoklu karşılaştırma yöntemi; Dunn's) kullanıldı. İstatistik olarak $P < 0.05$ ise anlamlı kabul edildi. Bütün analizlerde, *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) bilgisayar programı 13,0 kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

4.1.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Sisplatine bağlı oksidatif stres üzerine üzüm çekirdeği özütü (ÜÇÖ) ve esansiyel kekik yağı (EKY) etkisinin değerlendirilmesinde; serum oksidan/ antioksidan durumunun göstergesi olarak lipit peroksidasyonunun son ürünü malondialdehit (MDA) düzeyleri ve endojen antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçüldü. MDA seviyeleri, SOD ve GSH-Px aktiviteleri ile ilgili veriler değerlendirildi (Tablo 4.1.).

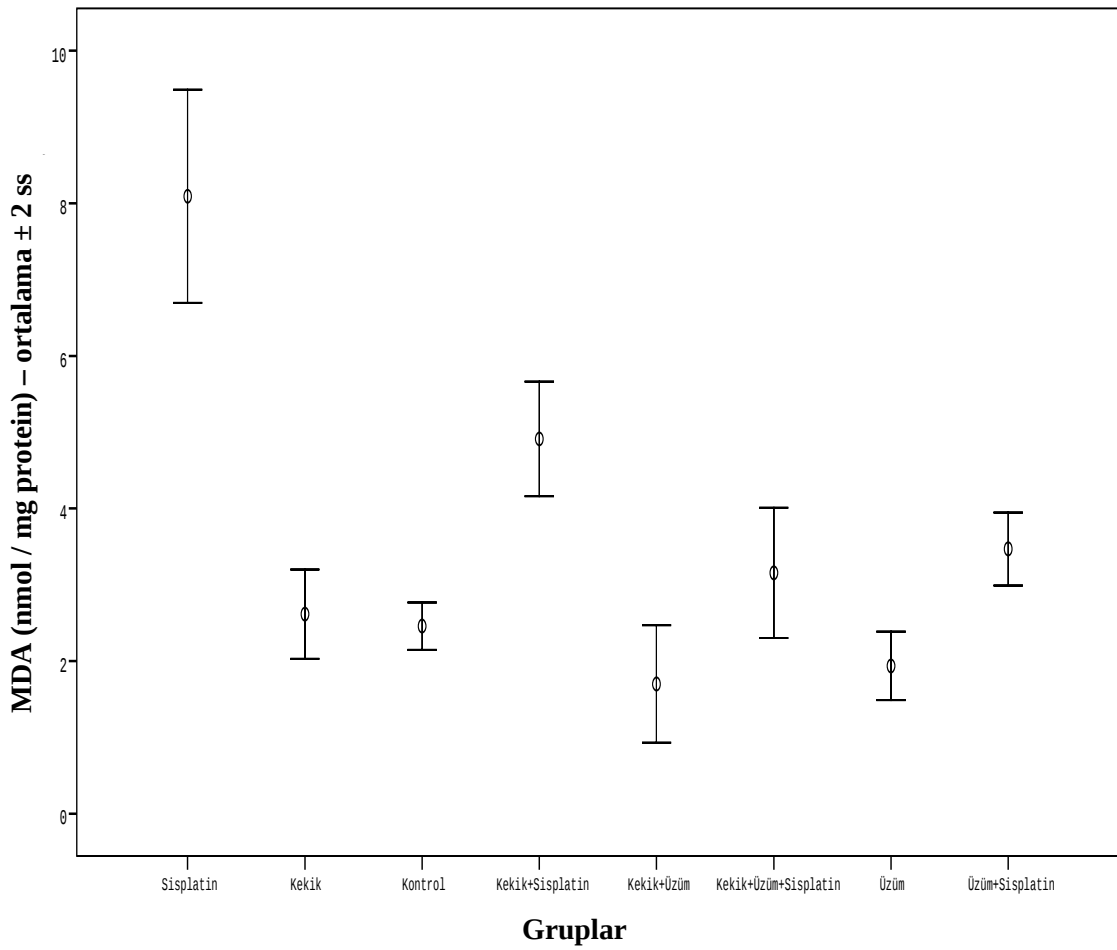
Tablo 4.1. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu oksidatif stres parametreleri

Gruplar	MDA	SOD	GSH-Px
	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$
Kontrol	2.459±0.155 ^a	0.189±0.003 ^a	20.288±1.323 ^a
Üzüm	1.938±0.225 ^b	0.204±0.009 ^b	22.208±1.688 ^b
Kekik	2.617±0.293 ^a	0.193±0.002 ^a	19.060±0.820 ^a
Üzüm + Kekik	1.699±0.385 ^c	0.213±0.004 ^c	23.417±1.266 ^b
Sisplatin	8.093±0.698 ^d	0.142±0.003 ^d	11.391±1.249 ^c
Üzüm + Sisplatin	3.470±0.239 ^e	0.166±0.004 ^e	15.638±0.916 ^d
Kekik + Sisplatin	4.911±0.375 ^f	0.152±0.004 ^f	13.248±0.797 ^e
Üzüm + Kekik + Sisplatin	3.157±0.427 ^e	0.182±0.003 ^g	16.089±0.863 ^d
P	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x} \pm ss$: Ortalama $\pm$ Standart Sapma, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH-Px: Glutatyon Peroksidaz, Alfabetik Üst Simgeler: Aynı Harfler; Gruplar Arasındaki Benzerliği, Farklı Harfler; Gruplar Arasındaki Farklılığı İfade Etmektedir.

4.1.1.1. MDA Düzeyleri

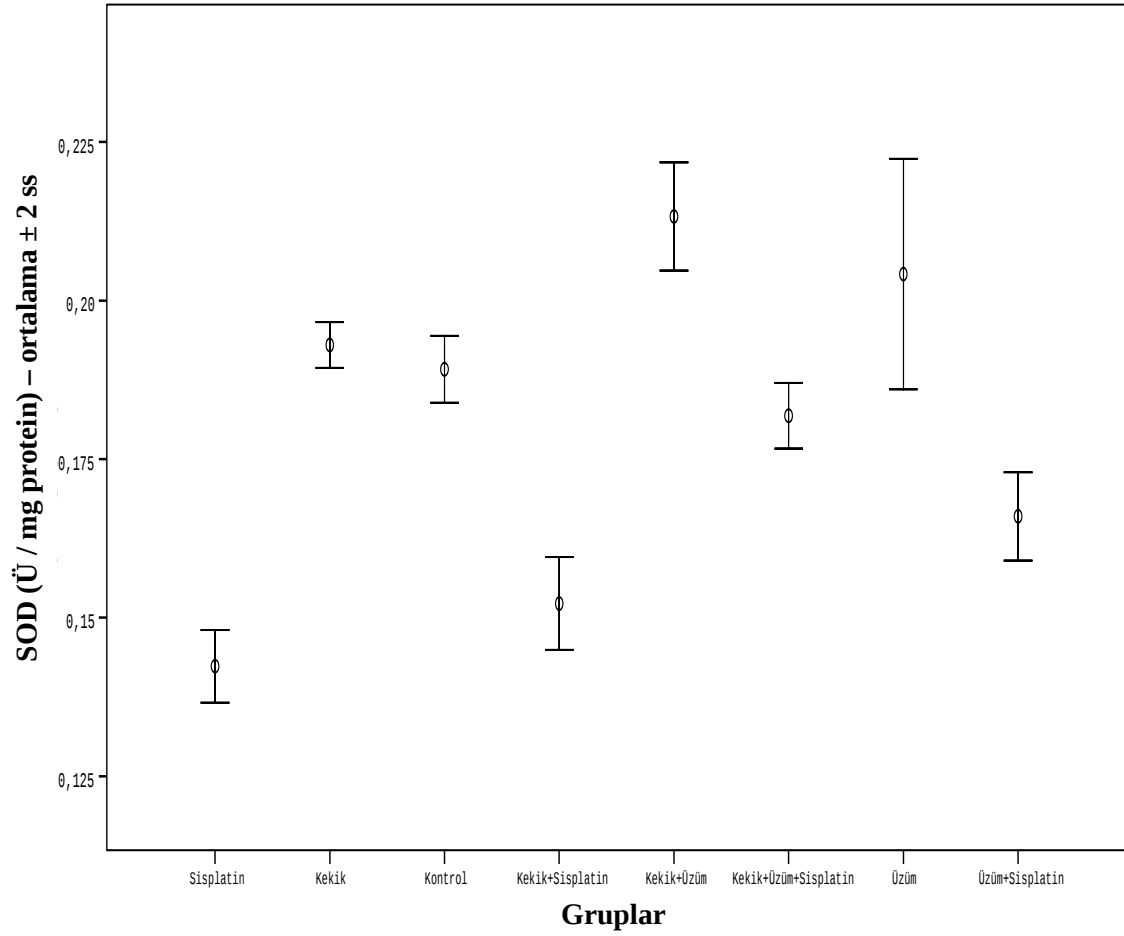
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre MDA değerleri açısından; Kontrol ve Kekik grupları arasında anlamlı düzeyde fark gözlenmedi. Üzüm+Sisplatin ve Üzüm+Kekik+Sisplatin grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$), (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri

4.1.1.2. SOD Aktiviteleri

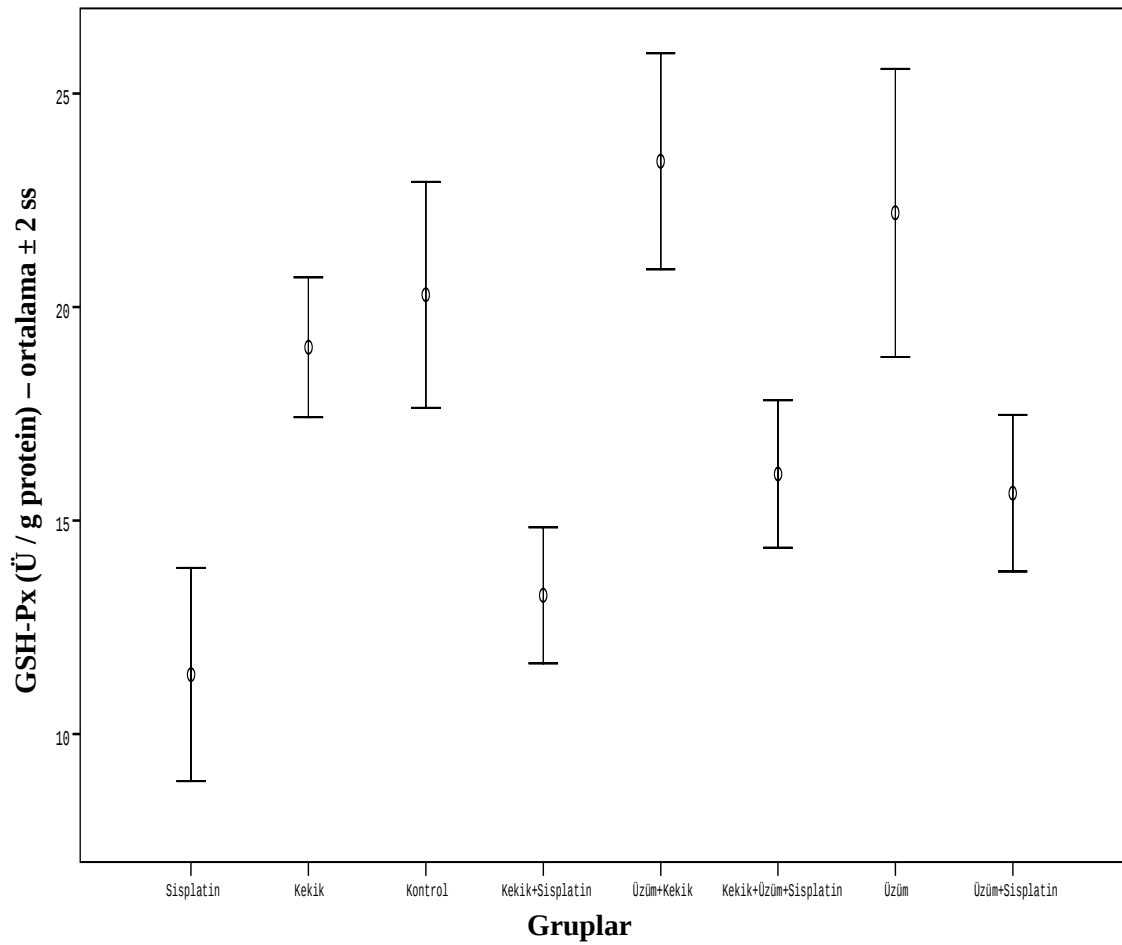
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre SOD değerleri açısından; Kontrol ve Kekik grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$), (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Karaciğer dokusu SOD aktiviteleri

4.1.1.3 GSH-Px Aktiviteleri

Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre GSH-Px değerleri açısından; Kontrol ve Kekik ile Üzüm ve Üzüm+Kekik grupları arasında anlamlı düzeyde fark gözlenmedi. Üzüm+Sisplatin ve Üzüm+Kekik+Sisplatin grupları arasında da anlamlı düzeyde fark gözlenmezken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$), (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Karaciğer dokusu GSH-Px aktiviteleri

4.1.2. Aminotransferaz Düzeyleri

Sisplatine bağlı karaciğer hasarı üzerine, ÜÇÖ ve EKY etkisinin değerlendirilmesinde; karaciğer fonksiyonlarının göstergesi olarak, sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri tayin edildi. ALT ve AST aktiviteleri ile ilgili veriler değerlendirildi (Tablo 4.2).

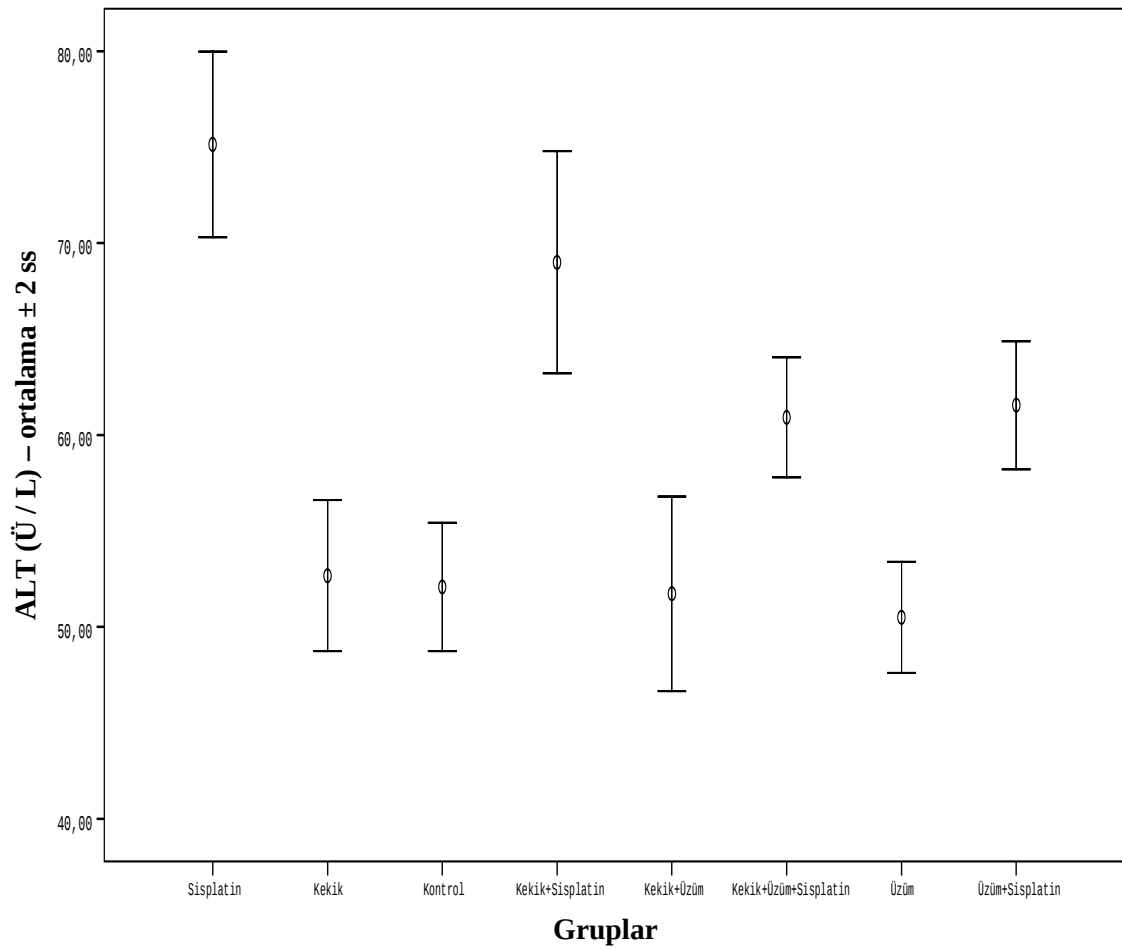
Tablo 4.2. Araştırma gruplarının serum aminotransferaz düzeyleri

Gruplar	ALT	AST
	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$
Kontrol	52.083±1.676 ^a	119.167±4.529 ^a
Üzüm	50.500±1.446 ^a	122.583±7.141 ^a
Kekik	52.667±1.969 ^a	123.833±5.374 ^a
Üzüm + Kekik	51.727±2.533 ^a	122.364±7.186 ^a
Sisplatin	75.142±2.420 ^b	257.713±11.934 ^b
Üzüm + Sisplatin	61.556±1.667 ^c	186.111±17.617 ^c
Kekik + Sisplatin	69.000±1.564 ^d	236.000±10.737 ^d
Üzüm + Kekik + Sisplatin	60.917±1.564 ^c	189.917±15.675 ^c
P	< 0.001	< 0.001
ALT: Alanin Transaminaz, AST: Aspartat Transaminaz Alfabetik Üst Simgeler: Aynı Harfler; Gruplar Arasındaki Benzerliği, Farklı Harfler; Gruplar Arasındaki Farklılığı İfade Etmektedir.		

AST ve ALT düzeyleri; sisplatin grubunda, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu.

4.1.2.1. ALT Enzim Düzeyleri

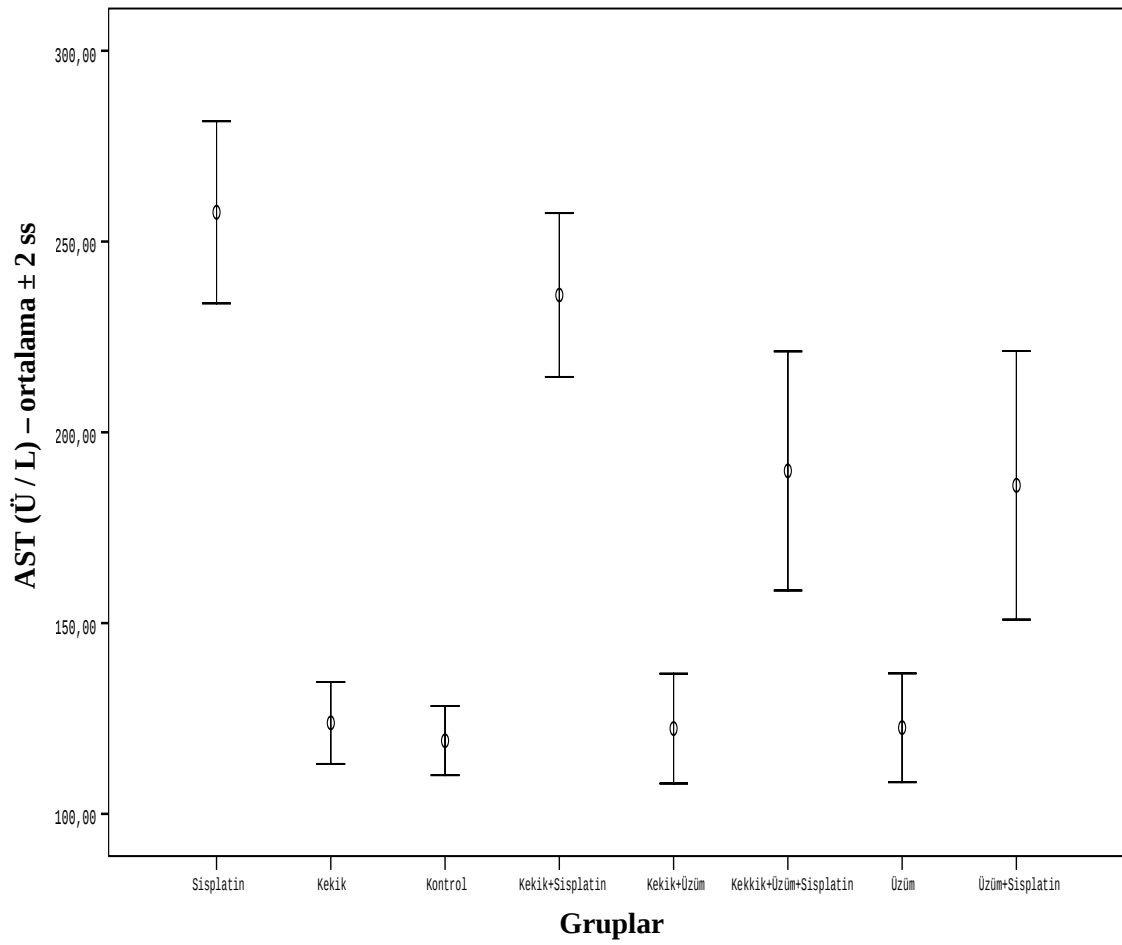
Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, ALT değerleri açısından; Kontrol ve Kekik ile Üzüm ve Üzüm+Kekik grupları arasında anlamlı düzeyde fark gözlenmedi. Üzüm+Sisplatin ve Üzüm+Kekik+Sisplatin grupları arasında da anlamlı düzeyde fark gözlenmezken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$), (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Serum ALT düzeyleri

4.1.2.2. AST Enzim Düzeyleri

Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre, AST değerleri açısından; Kontrol ve Kekik ile Üzüm ve Üzüm+Kekik grupları arasında anlamlı düzeyde fark gözlenmedi. Üzüm+Sisplatin ve Üzüm+Kekik+Sisplatin grupları arasında da anlamlı düzeyde fark gözlenmezken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$), (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Serum AST düzeyleri

4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sisplatin toksisitesinin yarattığı karaciğer hücre hasarının, yaygınlığı ve derecesine; ÜÇÖ ve EKY'nin etkisini değerlendirmek için, sıçanların karaciğer dokusunun histolojik değerlendirilmesinde; hücre hasarının yaygınlığı ve derecesi 0–3 değerleri arasında semi-kantitatif olarak skorlandı. Semi-kantitatif histopatolojik değerlendirme yöntemi ile spesifik kriterlere göre iki patolog tarafından körlemesine değerlendirme yapıldı. Histopatolojik incelemeler için; deney grubundan alınan karaciğer doku örnekleri % 10 fosfat tamponlu formalin çözeltisinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Daha sonra, parafin bloklardan 5µm'lik kesitler alındı ve hematoksilen-eozin (H&E) ile boyandı. Kesitler, körlemesine ışık mikroskopunda incelendi ve aşağıdaki derecelendirme sistemine göre histopatolojik değişiklikler skorlandı; (0): Normal, (1): Hafif hidropik dejenerasyon (Kupffer hücrelerinde çoğalma ve nekroz yok), (2): Orta derecede hidropik dejenerasyon (Kupffer hücrelerinde çoğalma ve nekroz çok az yada hiç yok), (3): Şiddetli hidropik dejenerasyon (Kupffer hücrelerinde çoğalma ve nekroz) (103). Belirtilen yöntemle göre; karaciğer hasarı parametreleri istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Araştırma gruplarının karaciğer dokusu histopatolojik değerlendirme sonuçları

Gruplar	Histopatolojik değerlendirme
	Ortanca (25'inci-75'inci persentil)
Kontrol	0 (0-0) ^a
Üzüm	0 (0-1) ^{ad}
Kekik	0.5 (0-1) ^{acd}
Üzüm + Kekik	1 (1-0) ^{abcd}
Sisplatin	2 (1.75-2.25) ^b
Üzüm + Sisplatin	1 (1-2) ^{bcd}
Kekik +Sisplatin	1 (1-2) ^{bcd}
Üzüm + Kekik + Sisplatin	1 (1-1.5) ^{bcd}
P	<0.001

Grupların çoklu karşılaştırılmasına göre histopatolojik değerleri açısından; Üzüm+Sisplatin, Kekik+Sisplatin ve Üzüm+Kekik+Sisplatin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), grupların diğer ikili karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde fark olduğu ($p<0.001$) gözlemlendi.

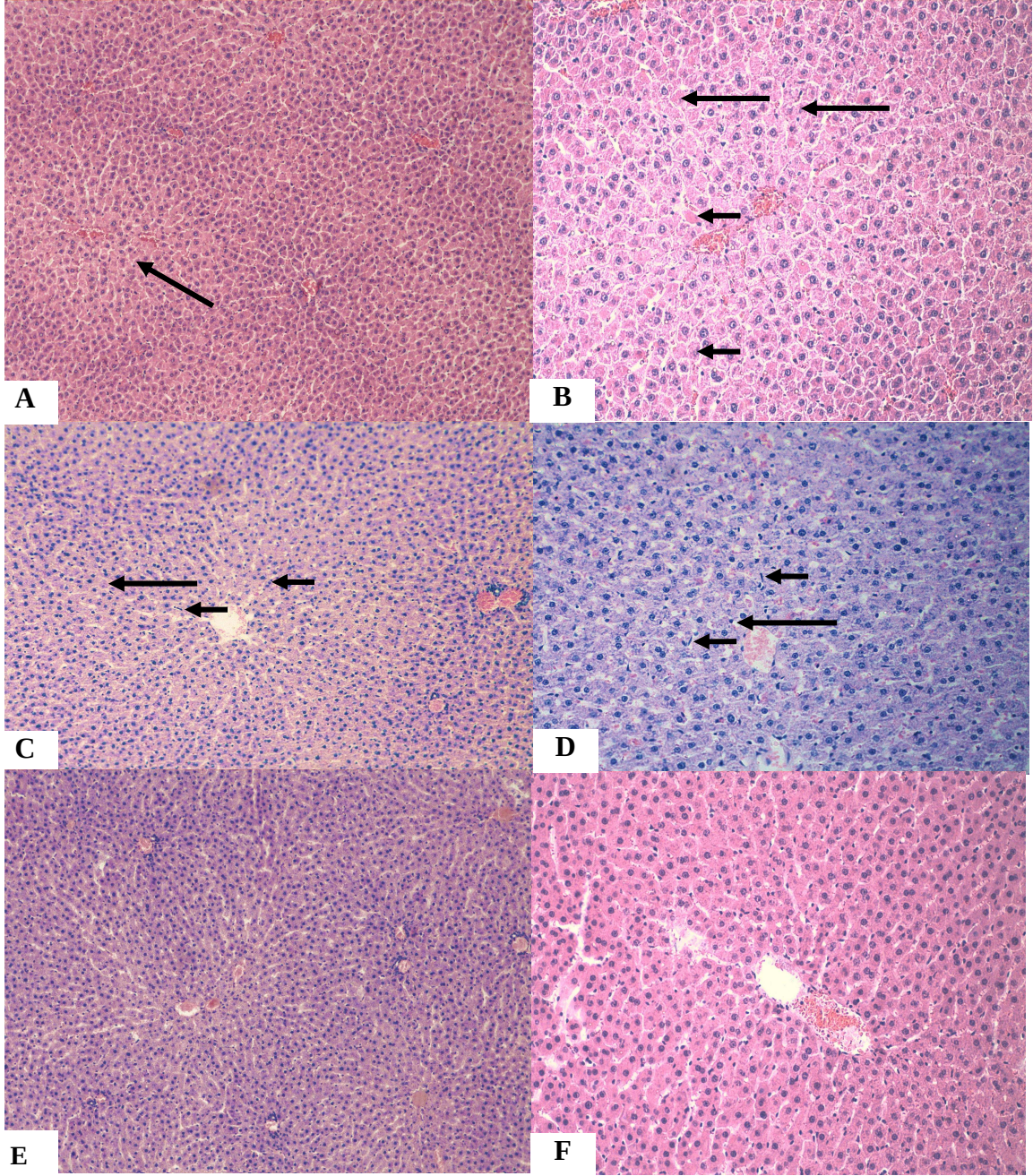
4.2.1. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Araştırma gruplarının karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde;

Şiddetli karaciğer hasarını ifade eden A ve B resminde; santral ven ve portal mesafe ilişkisi bozulmuş olup, sinüzoidal dilatasyon, şiddetli hidropik ve vakuoler dejenerasyonun eşlik ettiği, karaciğer hasarının temel bulgusu olan, karaciğer dokusu parankim hücre hasarı ve hepatosit nekrozu görülmektedir.

Orta dereceli karaciğer hasarını ifade eden C ve D resminde; santral ven portal mesafe ilişkisi bozulmuş olmakla birlikte, orta dereceli hidropik dejenerasyonun eşlik ettiği ve karaciğer hasarının ikincil bulgusu olan Kupffer hücre proliferasyonu görülmektedir. Hepatosit nekroz bulgusu yoktur.

Normal histopatolojik bulguları ifade eden E ve F resminde; santral ven portal mesafe ilişkisi korunmakta olup, hücreler medüller kordonlarda düzgün bir dağılım göstermektedirler.



Resim 4.1. Resim A ve B’de: Şiddetli hidropik dejenerasyon ve hepatosit nekrozu; Resim C ve D’de: Orta derecede hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre proliferasyonu, nekroz yok; Resim E ve F’de: Kontrol grubunda normal histopatolojik bulgular

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antikanserojen ajanların pek çoğu, oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak, çeşitli organ ve dokularda toksisiteye neden olmaktadır (104,105). En aktif kemoterapötik antitümör ajanlardan biri olarak bilinen sisplatinin; özellikle, baş, boyun, testis, yumurtalık, mesane ve küçük hücreli akciğer tümörleri gibi çeşitli neoplazmlara karşı aktivitesi gösterilmiştir (106). Sisplatinin güçlü antitümör aktivitesine rağmen, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi sık görülen ve istenmeyen, doz sınırlayıcı yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı sınırlandırılmıştır (107,108). Bununla birlikte hepatotoksisite gibi, sisplatinin yüksek dozlarda uygulanmasından sonra görülebilen ve hastanın klinik durumunu değiştirebilen toksik etkileri de mevcuttur (109-111).

Sisplatin toksisitesine karşı pek çok stratejiler geliştirilmiş, eş zamanlı olarak koruyucu ajan takviyesiyle sisplatinin yan etkilerini önleyici pek çok çalışma yapılmıştır (112). Farklı çalışmalarda; sisplatinin yan etkilerine karşı farklı kimyasal yapıdaki ilaçlar ve destek besinlerin koruyucu olabileceği yönünde bulgular bildirilmiştir (113-117). Sisplatine bağlı yan etkilerin altında yatan mekanizma açıkça anlaşılamamış olsa da, farklı mekanizmaların bir kombinasyonunun etken olabileceği düşünülmektedir (118-121). Antioksidan savunma sistemini etkileyebilen ve farklı dokulardaki oksidatif hasarla sonuçlanan SOR üretimi nedeniyle hücre fonksiyonlarının bozulmasının söz konusu mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir (10,122-124).

Sisplatin kemoterapisine bağı olan, serum antioksidan düzeylerindeki düşüş; yaygın olarak kullanılan antitümör ajanların neden olduğu oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma sistemlerini başarısızlığa uğratabilmektedir (7). Hücre içi temel antioksidan enzimlerden biri olan SOD, süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüştürür. GSH-Px ise; hidrojen peroksidi suya dönüştürerek detoksifiye eder. Hücrel hasar yaratabilme kapasitesine sahip olan SOR, enzimatik ve non-enzimatik olarak iki grupta incelenmektedir ve genel olarak; süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil ve nitrik oksit radikallerini kapsamaktadır (125). Sisplatinin hücrel antioksidan aktiviteyi azalttığını gösteren pek çok çalışma vardır. İşeri ve ark. (126), sisplatin verilen sıçanlar ile yaptıkları çalışmada; sisplatin grubunda kontrol grubuna göre serum ALT ve AST düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığını, Iraz ve ark. (124), sisplatin ile yaptıkları deneysel çalışmada; sisplatin grubunda kilo kaybı ile antioksidan SOD ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı ölçüde azalma olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hepatotoksisite; Sisplatin grubunda, kilo kaybı ile ALT ve AST düzeylerindeki artışların eşlik ettiğı hepatik oksidatif hasar ile yine Sisplatin grubunda MDA düzeylerindeki artışa karşın, SOD ve GSH-Px aktivitelerindeki azalmayla karakterizedir.

Öte yandan sisplatinin antitümör aktivitesinin; DNA ile çapraz bağlanmalar yapabilmesini sağlayan, DNA etkileşimleri yapabilme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sisplatin tabanlı kemoterapinin antitümör etkinliğı ve yan etkileri; ilacın antitümör etkinliğı değiştirilmeksizin, farklı mekanizmaların aracılık ettiğı korunma yöntemlerinin araştırılmasını ve belirli yan etkilerin seçici inhibisyonu üzerine yapılabilecek uygulamaların sağlanabilmesini gerektirmektedir (127). Yapılan çalışmalarda antioksidan olarak bilinen; melatonin, vitamin C, vitamin E, siyah kuru üzüm ve domates suyunun akut sisplatin nefrotoksisitesinde, kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve elajik asidin de sisplatin hepatotoksisitesinde olumlu etkileri bildirilmiştir (124,128-132). Sisplatin tabanlı kemoterapinin yan etkileri için; farklı kimyasal yapıya sahip koruyucu ajanların kombine olarak kullanılmasıyla sağlanabilen, potansiyel uygulamalar öngörülebilir. Yine de, şimdiye kadar üzüm çekirdeğı özütü (ÜÇÖ) ve esansiyel kekik yağı (EKY) gibi bitkisel kökenli antioksidanların tek başına veya kombine uygulamaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada sisplatin hepatotoksisitesini önleyici ÜÇÖ ve EKY gibi ajanların hem ayrı hem de optimum kombinasyonlarının incelenmesi denenmiştir.

Genel olarak sisplatin kaynaklı karaciğer toksisitesi; serum transaminaz düzeylerinin ılımlı ölçüde artışı ile veya daha nadiren de serum alkalen fosfataz, laktat dehidrojenaz (LDH) ve *c*-glutamil transpeptidaz düzeylerinin ılımlı artışı ile karakterizedir (111). Apoptotik lezyonların, karaciğer parankim hasarı ile karakterize olarak görünmesine rağmen, sisplatine bağlı olan karaciğer hasarının mekanizması hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Koç ve ark.'nın (123) yaptığı bir çalışmada; sisplatine bağlı olan karaciğer hasarı karaciğer dokularının histolojik analizlerinde, özellikle hücrelerin çevresindeki santral venlerdeki değişimler ile hepatoselüler vakuolizasyonlar ve sinüzoidal dilatasyonlar ile açıklanmıştır. Sisplatin uygulaması, karaciğerde mikroskopik olarak da gözlenebilecek çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Karaciğer hücre morfolojisi; çeşitli Kupffer hücre aktivasyonlarıyla, hepatositlerin dejenerasyonu ve sinüzoidlerin hafifçe genişlemesi ile karakterizedir. Benzer şekilde, biz de mevcut çalışmamızda, sisplatin verilen grupta; hepatoselüler vakuolizasyon, hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre proliferasyonu ve sinüzoidal dilatasyon bulgularını saptadık. Sisplatin grubunda; serum karaciğer enzim düzeylerinin yükselmesi karaciğer fonksiyonlarının bir göstergesidir. Sisplatin; süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali gibi aktif oksijen türlerini üretebilmektedir (133-135). Ayrıca karaciğer dokularında lipit peroksidasyonunu arttırabilmektedir (126). Artan lipit peroksidasyonu; nefrotoksisiteyi başlatarak, aynı zamanda hepatotoksisiteye de neden olan sisplatinin dozu hakkında bir fikir vermektedir.

Clerici ve ark.'nın (136) yaptığı çalışmada; sisplatin, OH[•] ve diğer serbest radikallerin artışına, Sasada ve ark.'nın (137) yaptığı bir çalışmada ise; peroksit radikallerinin artışına neden olmuştur. Sıçanlarda yapılan *in-vivo* çalışmalarda siplatinin SOD ve GSH-Px gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürerek, reaktif oksijen türlerini yakalamakla görevli olan GSSH'un seviyesini de azalttığı gösterilmiştir (138-141). Artan reaktif oksijen türleri de DNA hasarına ve membranlarda lipit peroksidasyonuna neden olabilmektedir (142). Yine Sugiyama ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise sisplatinin; dokuda SOD, GSH-Px gibi serbest radikal yakalayıcı enzimlerin aktiviteleri ile GSSH'un düzeylerini azaltırken, O₂^{-•} başta olmak üzere oksijen radikallerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (143).

Sisplatinin oksidatif hasara bağlı bir mekanizma ile toksik etki gösterdiğini kanıtlayan bütün bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da Sisplatin grubu diğer

gruplarla karşılaştırıldığı zaman; oksidatif hasarın belirteci, lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Yine benzer şekilde diğer gruplarla karşılaştırıldığında Sisplatin grubunda; antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px düzeyleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

Antioksidan niteliği olan ÜÇÖ, serbest radikal temizleyici aktiviteye sahiptir (53,54). Son yıllarda yapılan bir çalışmada; üzüm çekirdeği proantosiyanidin özütünün çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunu, düşük konsantrasyonlarda (2 mg/ L) dahi inhibe edebildiği gösterilmiştir (49). Serbest radikal *in-vitro* temizleme analiziyle yapılan başka çalışmalarda ise; üzüm çekirdeği proantosiyanidin özütünün (50 mg/ L), serbest radikallere karşı C ve E vitaminlerinden daha güçlü bir koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (57). ÜÇÖ (75 mg/ kg) ve *Marjoram* esansiyel yağının (0,16 mL/ kg) birlikte verilmesinin; etanolün fertilité üzerindeki olumsuz etkileri ile karaciğer ve beyin dokularında yaptığı tahribatı, oksidatif hasarı önlemek suretiyle azalttığı bildirilmiştir (59). Dulundu ve ark. (61); ÜÇÖ'nün (günde 50 mg/ kg oral doz, 28 gün), sıçanlarda safra kanalı bağlandıktan sonra karaciğeri oksidatif hasardan koruduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda; ÜÇÖ'nün antioksidan etkisiyle, sisplatine bağlı karaciğer hasarında olumlu etkileri gösterilmiştir.

Esansiyel kekik yağının ana bileşenlerinden olan karvakrol'un, antioksidan ve karaciğer koruyucu özellikleri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (144,145). Canbek ve ark.'nın (145) yaptığı çalışmada; iskemi-reperfüzyon sonrası artış gösteren ALT ve AST düzeylerinin karvakrol verilmesiyle düzeldiği ve karaciğer fonksiyonlarındaki bu düzelmeyi karvakrolün, lipid peroksidasyonunu azaltarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Yine Botsoglou ve ark.'nın (146) yaptığı bir çalışmada; karbon tetraklorüre bağlı oksidatif strese karvakrolün, lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkisiyle, yükselen ALT ve AST düzeylerinin normale dönmesini sağladığı bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda çoğunlukla, sisplatinin oksidatif hasara bağlı bir mekanizma ile toksik etki gösterdiği fikrinden yola çıkılarak, antioksidan etkisi birçok alanda denenmiş ancak sisplatin hepatotoksitesinde henüz yeterli düzeyde çalışılmamış ÜÇÖ ve EKY'nı kendi çalışmamızda, sisplatin ile hepatotoksite oluşturulan sıçanlara uyguladık ve serum oksidan/ antioksidan sistem üzerine olan etkilerini araştırdık. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, sıçanlar üzerinde denenilen sisplatinin karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu artışıyla karakterize oksidatif hasar sonucu

hepatotoksisiteye yol açtığı kanısına varıldı. Bu durum, hücrel membran hasarının kaynağı olduğuna inanılan, serbest oksijen radikal aracılı lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesinin karaciğer doku homojenatı örneklerinde, Kontrol grubuna göre, Sisplatin grubunda anlamlı olarak yüksek bulunması ile açıklandı. MDA seviyesi, Sisplatin grubuna göre Üzüm+Sisplatin ve Kekik+Sisplatin grubunda anlamlı olarak daha düşük tespit edildi.

Diğer gruplarla karşılaştırıldığında, Sisplatin grubunda; antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük bulunması, sisplatin uygulamasının endojen antioksidan enzim aktivitesini azalttığını göstermektedir. Bu durum, Kontrol grubuna göre Sisplatin grubunda, karaciğer doku homojenatı SOD ve GSH-Px aktivitelerinin daha düşük ölçülmesiyle açıklandı. Sisplatin grubu ile Üzüm+Sisplatin grubu ve Kekik+Sisplatin grubu karşılaştırıldığında, enzim aktivitelerindeki azalmanın ÜÇÖ ve EKY uygulanmasıyla engellendiği belirlendi. Aynı zamanda, Kontrol grubuna göre Üzüm ve Kekik grubunda karaciğer doku homojenatı SOD ve GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak daha yüksek bulunması; EKY'nın ve özellikle de ÜÇÖ'nün endojen antioksidan enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir.

Sisplatin grubunda; serum karaciğer enzim düzeylerinin yükselmesi, karaciğer doku hasarının bir göstergesidir. Üzüm ve Kekik grubunda, karaciğere özgü fonksiyonel enzimler olan ALT ve AST seviyelerinin Kontrol grubuna yakın değerlerde olması da yine ÜÇÖ ve EKY'nın; serbest radikallerin detoksifikasyonunda rol oynayan, yüksek oranda içerdikleri fenolik bileşenlerden kaynaklanan, antioksidan ve hepatoprotektif özellikte olmalarının bir sonucu olduğunu göstermiştir.

Sıçanlarda, 7 mg/ kg (ip.) sisplatin doz uygulaması ile oluşturulan karaciğer hasarı histopatolojik olarak incelendiğinde ise, karaciğer hücre hasarının yaygınlığı ve derecesine göre semi-kantitatif olarak skorladığımız karaciğer hücre hasarının şiddeti; Sisplatin grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hasarın histopatolojik olarak değerlendirilmesinde, sisplatin ile muamele edilen grupta; hepatoselüler vakuolizasyon, hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre proliferasyonu ve sinüzoidal dilatasyon gözlemlendi. Ayrıca; santral ven ve portal mesafe ilişkisi bozulmuş olup; sinüzoidal dilatasyonlar ile şiddetli hidropik ve vakuoler dejenerasyonun eşlik ettiği, karaciğer hasarının temel bulgusu olan karaciğer dokusu parankim hücre hasarı ve hepatosit nekrozu gözlemlenmiştir. Sisplatin grubu ile Üzüm+Sisplatin grubu ve

Kekik+Sisplatin grubu karşılaştırıldığında, karaciğer dokusu hasarı derecesinin; Üzüm ve Kekik gruplarında, Sisplatin grubuna oranla anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi.

Üzüm ve Kekik gruplarında ise; her iki grupta da göze çarpan Kontrol grubuna yakın değerler, sisplatin kaynaklı hepatotoksisitenin azaltılmasında, hem ÜÇÖ'nün hem de EKY'nın etkinliğini göstermektedir. Ancak, özellikle Üzüm grubuna ait değerlerin Kontrol grubuna daha yakın oluşu; sisplatine bağlı karaciğer hepatotoksisitesinin azaltılmasında ÜÇÖ'nün EKY'dan daha etkin olduğunu göstermektedir.

Bulgularımıza göre, sisplatin ile oluşturulan karaciğer hasarının temelinde hücre savunma sisteminin bozulması söz konusudur. Sisplatine bağlı lipid peroksidasyon artışı sonucu gelişen oksidatif hasara karşı güçlü bir antioksidan olan ÜÇÖ koruyucu bir etkinlik gösterirken, EKY da kısmen koruyucu özelliktedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada antioksidan etkinliği gösterilen ÜÇÖ ve EKY'nın, kullanılmasıyla elde ettiğimiz sonuçların sisplatine bağlı hepatotoksisite mekanizmasının anlaşılmasına ışık tutacağı ve hepatotoksisitenin azaltılmasına yardımcı olarak, klinik ve prelinik uygulamalara katkıda bulunacağı kanısındayız. Ayrıca bu çalışmanın; sisplatinin istenmeyen hepatotoksik yan etkilerinin daha ekonomik, etkili ve kolay uygulanabilir alternatif fitoterapötik ajanlarla önlenilebileceği veya azaltılabileceği konusunda bir yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda, ÜÇÖ ve EKY'nın hepatotoksisiteye karşı koruyucu olarak kullanılması önerilebilir. Ancak, bu deneysel çalışma sisplatinin oluşturduğu karaciğer hasarına karşı ÜÇÖ ve EKY etkisinin değerlendirildiği ilk çalışma olduğundan, etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, doz ve tolerabilite konularının tamamen açıklığa kavuşturulabilmesi gerekmektedir. Sisplatine bağlı karaciğer hasarında ÜÇÖ ve EKY'nın kesin tedavi edici ilaçlar olarak değerlendirilebilmesi için henüz çok erkendir. Bu nedenle farklı doz, farklı süre ve farklı denek sayılarıyla yeni çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Salmon SE, Sartorelli AC. Cancer Chemotherapy. In: Katzung BG (eds.), Basic & Clinical Pharmacology. San Francisco 2001; pp 923-958.
2. Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. Baskı, Ankara 1998; ss 376-390.
3. Rang HP, Dale MM. Cancer Chemotherapy. In: Pharmacology ELBS, Hong-Kong 1993; pp 781-803.
4. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. 4. Cilt, Feryal Matbaası, Ankara 1994; s 1047.
5. Choei DD, Longnecker DS, del Campo AA. Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. *Lab Invest* 1981; 44: 397-402.
6. Antunes LM, Darin JD, Bianchi ND. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43(2): 145-150.
7. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy OA. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195: 221-230.
8. Allan SG, Smyth JF. Small intestinal mucosal toxicity of cis-platinum comparison of toxicity with platinum analogues and dexamethasone. *Br J Cancer* 1986; 53(3): 355-360.

9. Erlenbach B, Grunewald RW, et al. Cisplatin nephrotoxicity in children after continuous 72-h and 3×1-h infusions. *Pediatr Nephrol* 2001; 16: 586-593.
10. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(6): 656-661.
11. Algier LA, Hanoglu Z, Özden G, Kara F. The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patient in Turkey. *Eur J Oncol Nurs* 2005; 9: 138-146.
12. Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, Ozden G. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. *Ann Oncol* 2005; 16: 655-663.
13. Niggeman B, Grüber C. Side effects of complementary and alternative medicine. *Allergy* 2003; 58: 707-716.
14. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* and its bioactive compounds. *Phytother Res* 2009; 23: 1197-1204.
15. Vichi S, Zitterl-Eglseer K, Jugl M, et al. Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and Oregano extracts added to animal fat by means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis. *Nahrung/ Food* 2001; 45(2): 101-104.
16. Hartwell JL. Plants used against cancer: A survey. *Quarterman Publications*, Mass., Lawrence 1982.
17. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1229-1235.
18. Antunes LM, Araujo MC, Darin JD, Bianchi ML. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 2000; 465 (1-2): 131-137.
19. Olinski R, Wedrychowski A, Schmidt WN, et al. *In-vivo* DNA-protein cross-linking by *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1987; 47(1): 201-205.
20. Klaassen CD. Toxic responses of the kidney. Casarett and Doull's Toxicology 5th (ed.), United States: *The McGraw-Hill Companies*, 1996; pp 437-439.
21. Welters MJP, Fichtinger-Schepman AMC, Baan RA, et al. Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: Correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity *in-vitro* and *in-vivo*. *Br J Cancer* 1999; 79(1): 82-88.

22. Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in cisplatin. In: Lippert B (ed.), *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Switzerland; Wiley-VHC, Basel 1999; p 144.
23. Blakley BW, Gupta AK, Myers SF, Schwan S. Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120(5): 541-6.
24. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd (eds.), Clarendon Press, Oxford 1989; pp 10,73-128, 247-249, 432-433.
26. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferenčík M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 18-19.
27. Tanırgan G, Koldaş M, Uras F. Free radicals: An introduction to free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni*, İstanbul 1994; 32(4): ss 304-308.
28. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 2007; 39(1): 44-84.
29. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.
30. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
31. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Wien Klin Wochenschr* 1991; 69: 965-968.
32. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, et al. Pesticides and oxidative stress: A review. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): 141-147.
33. Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 505-510.
34. Pastor GMC, Sierra C, Dolade M, Navarro E. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem* 1998; 44 (5): 924-929.
35. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları Sağlık Dizisi*, Konya 1995; 5: ss 38-42.
36. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle check-point function. *Free Radical Bio Med* 2000; 28(9): 1387-1404.

37. Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struc-Theochem* 2003; 387-392, 666-667.
38. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 481-493.
39. Sorg O. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *CR Biol* 2004; 327(7): 649-662.
40. Kasprzak KS. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Bio Med* 2002; 32(10): 958-967.
41. Coles B, Rhoads K. Smoking nitric oxide and free radicals. *Br J Surg* 1994; 81: 1693-1700.
42. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress. *Clin Chem* 1997; 43 (7): 1209-1214.
43. Cheeseman K, Esterbauer H, Collins M. Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues. *Biochem J* 1986; 235: 507-514.
44. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* 2005; 24: 172-183.
45. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
46. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 181-200.
47. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of the superoxide dismutases: Putting the metal of the pedal. *Biochim Biophys Acta- BBA Mol Cell Res* 2006; 1763(7): 747-758.
48. Szaleczky E, Prechl J, Feher J, Somogyi A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus: A rational approach. *Postgrad Med J* 1999; 75: 13-17.
49. Cetin A, Sagdic O. A Concise Review : Antioxidant Effects and Bioactive Constituents of Grape. *Erciyes Medical Journal* 2009; 31(4): 369-375.
50. Yadav M, Jain S, Bhardwaj A, et al. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: An update. *J Med Food* 2009; 12(3): 473-484.
51. Demir BS, Serindag O. Determination of boron in grape (*Vitis vinifera*) by azomethine H spectrophotometric method. *Eurasian J Anal Chem* 2006; 1: 11-18.

52. Sağdıç O, Ekici L. Üzüm (*Vitis vinifera*) Çekirdeğinin Fenolik Bileşikleri ve Biyoaktif Özellikleri. *Hasad Gıda* 2005; 21: 244.
53. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int* 2003; 36: 117-122.
54. Caillet S, Salmieri S, Lacroix M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chem* 2006; 95: 1-8.
55. Facino MR, Carini M, Aldini G, et al. Sparing effect of procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E: *In-vitro* studies. *Planta Med* 1998; 64: 343-347.
56. Facino MR, Carini M, Aldini G, et al. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidins from *Vitis vinifera*: A mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 592-601.
57. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicol* 2000; 148: 187-197.
58. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 771-776.
59. El-Ashmawy IM, Saleh A, Salama OM. Effects of *Marjoram* volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 320-327.
60. Ray SD, Kumar MA, Bagchi D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases *in-vivo* Bcl-XL expression and prevents asetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: 42-58.
61. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, et al. Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 885-892.
62. Sehirli O, Ozel Y, Dulundu E, et al. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytother Res* 2008; 22: 43-48.
63. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, et al. Role of grape seed extract on methotrexate-induced oxidative stress in rat liver. *Am J Chin Med* 2008; 36: 861-872.

64. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, et al. The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *Turk J Gastroenterol* 2008;19: 92-98.
65. Kokkini S. Herbs of the *Labiatae*. Encyclopedia of Food Science, *Food Technology and Nutrition*, Academic Press, London 1994; pp 2342-2348.
66. Davis PH. Flora of Turkey And The East Aegean Islands. V: 2, Edinburgh University Press, Edinburg 1982; 7: pp 36-42, 297-313.
67. Oflaz S, Kürkçüoğlu M, Başer KHC. *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* üzerine farmakognozik çalışmalar, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 2002; ss 252-258.
68. Zeybek N, Zeybek U. Farmasötik Botanik, Kapalı Tohumlu Bitkiler (*Angiospermae*) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 2. Baskı, Ege Üniversitesi Yay. No: 2, Ege Üniversitesi Basımevi, 369, Bornova-İzmir 1994.
69. Banfi A, Leibinger J, Molnar L, et al. Lotion for Hair Treatment. *Herberia Orszagos Gyogynovenyforgalmi Kozos Vallalat, Belg*, 884, 621, (CI.A6IK), 4 Feb 1981, Hung Appl. 80/1, 047, 28 Apr. 1980; 14, CA 94: 180499 s (1981).
70. Tümen G, Sekendiz OA. Balıkesir ve Merkez Köylerinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 86/ 12, Balıkesir 1989; s 110.
71. Dymock W, Warden EJH, Hooper D. Pharmacographia Indica. *Thacker Spink & Co, Calcutta* 1890, p 113.
72. Kintzios SE. *Oregano: The Genera Origanum and Lippia. Taylor & Francis Group*, London 2002; 3-4: pp 114-126.
73. Akgül A. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 15, Damla Matbaacılık ve Tic., Ankara 1993; 1-56: ss 101-104.
74. Reineccius G. Source Book of Flavors. Aspen Publishers Inc., 2nd (ed.), (Rev. Ed. Of: Source Book of Flavors/ Henry B. Heath. c.1981), Gaithersburg, Maryland 1994; pp 74-86.
75. Stahl- Biskup E, Saez F. Thyme: The *Genus Thymus. Taylor & Francis Group*, London 2002; pp 77-84.
76. Baydar H. Isparta Koşullarında İzmir Kekiğinin (*Origanum onites* L.) Verimi ve Uçucu Yağ Kalitesi Üzerine Araştırmalar. *S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2002; 6: ss 17-24.

77. Kaloustian J, El- Moselhy TF, Portugal H. Chemical and thermal analysis of the biopolimers in Thyme (*Thymus vulgaris*). *Thermochimica Acta* 2003; 401(2): 19, 77-86.
78. Başer KHC. “Her derde deva bir bitki: Kekik.” *Bilim ve Teknik Dergisi* 2001; 74-77.
79. Gönüz A, Özörgücü B. An investigation on the morphology, anatomy and ecology of *Origanum L.* *Tr J of Botany* 1999; 23: 19-32.
80. Özhatay N, Atay S. Kekik in trade in Turkey. XI. World Forestry Congress, Antalya, Turkey, 3, Topic 15, A.K. Mukerjii, 13-22 October 1997.
81. Evans WC. Trease and Evans’ Pharmacognosy. 13th (ed.), Bailliere Tindall, London 1989; pp 421-429.
82. Baser KHC. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* 2008; 14(29): 3106-3119.
83. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanz. bd. 4, Birkhauser Verlag, Basel 1966; pp 289-345.
84. Teuscher E. Pharmazeutische Biologie. 4 bearb, Braunschweig, Wiesbaden, Vieweg 1990; p 337.
85. Jimenez J, Navarro MC, Montilla MP, et al. *Thymus zygis* oil, It’s effect on CCl₄-induced hepatotoxicity and free radical scavenger activity. *J Essent Oil Res* 1993; 5: 153-158.
86. Younos CH, Mortier F. Pharmacodynamic study of some essential oils of Afghanistan *Labiatae*. *Bull Soc Pharm Nancy* 1971; 90: pp 16-24. (*Chem. Abstr.* 76-149088m, 1972).
87. Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT. Anethofuran, carvone and limonene: Potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Planta Med* 1992; 58: 338-341.
88. Buchbauer G, Jirovitz L, Cezjka M, et al. New results in aromatherapy research. 23rd Int Symp on Essent Oils, Scottish Agricultural College, Book of Abstracts, Sept 9-12, Scotland, 1992; p18.
89. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004; 85: 633-640.
90. Sagdic O, Ozkan G, Aksoy A, Yetim H. Bioactivities of essential oil and extract of *Thymus argaeus*, Turkish endemic wild thyme. *J Sci Food Agric* 2009; 89:791-795.

91. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. 5. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara 2005: ss 354-356.
92. Aras K, Erşen G. Klinik Biyokimya. 5. Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara 1975; ss 17-18.
93. Gokturk-Baydar, N, Ozkan G, Sagdic O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extract. *Food Control* 2004; 15: 335-339.
94. Singleton VL, Rossi JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphothungstic acid. *Am J Enol Viticult* 1965; 16: 144-158.
95. Gokturk Baydar N, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Int J Food Sci Tech* 2006; 41: 799-804.
96. Jayaprakasha GK, Jena BS, Sakariah KK. Improved liquid chromatographic method for determination of organic acids in leaves, pulp, fruits, and rinds of *Garcinia*. *J AOAC Int* 2003; 86: 1063-1068.
97. Yetim H, Sagdic O, Sarioglu K, Ekici L, Gonulalan Z, Ozkan M. Using thymes to improve flavour quality and shelf life of broiler chickens. The Scientific and Technology Research Council of Turkey (TUBITAK), Project Number: TOVAG 106O454 Ankara-Turkey 2008.
98. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: Protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 898-905.
99. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
100. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
101. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
102. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
103. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol* 2009; in press.

104. Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 71-74.
105. Fadillioglu E, Erdogan H. Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma oxidant/ antioxidant status in rats. *Pharm Res* 2003; 47: 317-322.
106. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 1985; 55: 2303-2315.
107. Molmann JE, Glover DJ, Hogan WM, Furman RE. Cisplatin neuropathy: Risk factors, prognosis, and protection by WR-2721. *Cancer* 1988; 61: 2192-2195.
108. Screnci D, Mckeage MJ. Platinum neurotoxicity: Clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches. *J Inorg Biochem* 1999; 77: 105-110.
109. Cersimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharm* 1993; 27: 438-441.
110. Cavalli F, Tschopp L, Sonntag RW, Zimmermann A. A case of liver toxicity following cis-dichlorodiammineplatinum (II) treatment. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 2125-2126.
111. Pollera CF, Ameglio F, Nardi M, et al. Cisplatin-induced hepatic toxicity. *J Clin Oncol* 1987; 5: 318-319.
112. Ali BH, Al Moundhri MS. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(8): 1173-1183.
113. Blakley BW, Cohen JI, Doolittle ND, et al. Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy. *Laryngoscope* 2002; 112(11): 1997-2001.
114. Leitaio DJ, Blakley BW. Quantification of sodium thiosulphate protection on cisplatin-induced toxicities. *J Otolaryngol* 2003; 32(3): 146-150.
115. Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, et al. Protective effects of *alpha*-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2004; 124(4): 421-426.
116. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2004; 114(3): 538-542.
117. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, et al. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2004; 40(11): 1713-1723.

118. Ramesh G, Reeves WB. TNF-*alpha* mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110(6): 835-842.
119. Nowak G. Protein kinase C-*alpha* and ERK 1/ 2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 2002; 277(45): 43377-43388.
120. Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of *gamma*-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate *beta*-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 142-148.
121. Xiao T, Choudhary S, Zhang W, et al. Possible involvement of oxidative stress in cisplatin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66(5): 469-479.
122. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, et al. Enzymatic studies of cisplatin-induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 532(3): 290-293.
123. Koc A, Duru M, Ciralik H, et al. Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. *Mol Cell Biochem* 2005; 278(1-2): 79-84.
124. Iraz M, Ozerol E, Gulec M, et al. Protective effect of caffeic acid penethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct* 2006; 24(4): 357-361.
125. Akyol O, Herken H, Uz E, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: The possible role of oxidant/ antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 995-1005.
126. İşeri S, Ercan F, Gedik N, et al. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology* 2007; 230: 256-264.
127. Leonetti C, Biroccio A, Gabellini C, et al. *Alpha*-tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy. *Int J Cancer* 2003; 104: 243-250.
128. Sato S, Yamate J, Saito T, et al. Protective effect of taurine against renal interstitial fibrosis of rats induced by cisplatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 365: 277-283.
129. Cloven NG, Re A, McHale MT, et al. Evaluation of *D*-methionine as a cytoprotectant in cisplatin treatment of an animal model for ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(6B): 4205-4209.

130. Han X, Chesney RW. Regulation of TauT by cisplatin in LLC-PK1 renal cells. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(8): 1067-1072.
131. Cetin R, Devrim E, Kilicoglu B, et al. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: Possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol* 2006; 26(1): 42-46.
132. Yüce A, Ateşşahin A, Ceribaşı AO, Aksakal M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101(5): 345-349.
133. Masuda H, Tanaka T, Takahama UT. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1175- 1180.
134. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, et al. *In-vitro* and *in-vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998 ; 53 : 394-401.
135. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 1988; 131: 518-526.
136. Clerici WJ, Hensley K, Dimartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 1996; 98(1-2): 116-124.
137. Sasada T, Iwata S, Sato N, et al. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): Protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 1996; 97: 2268-2278.
138. Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, et al. Cisplatin- nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 638-649.
139. Sadzuka Y, Shimizu Y, Takino Y. Role of glutathione S-transferase isoenzymes in cisplatin- induced nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Lett* 1994; 70: 211-222.
140. Mistry P, Merazga Y, Sapargo DJ, et al. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 28: 277-282.
141. Kuhlman MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478-2480.

142. Salahudeen A, Badr K, Morrow J, Roberts II J. Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F₂-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1300-1305.
143. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, et al. Adverse effect of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 1121-1127.
144. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, et al. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* 2008; 15: 447-452.
145. Canbek M, Uyanoglu M, Aral E, Başer KHC, et al. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine* 2008; 15: 226-229.
146. Botsoglou NA, Tatzoglou IA, Botsoglou E, et al. Effect of long-term dietary administration of oregano and rosemary on the antioxidant status of rat serum, liver, kidney and heart after carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *J Sci Food Agric* 2009; 89(8): 1397-1406 (10).

ÖZGEÇMİŞ

Ümit ARSLANBAŞ, Kayseri'nin Bünyan ilçesinde doğdu. Ortaöğrenimini İstanbul-Erenköy Kız Lisesi'nde tamamladı. Bir süre Dokuz Eylül Üniversitesi-Buca Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'ne devam ettikten sonra, Atatürk Üniversitesi-Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü'nünden mezun oldu.

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı. Halen eğitime devam etmektedir. Kayseri ili, Talas ilçesinde öğretmenlik yapmaktadır.

İletişim Bilgileri

Adres : Atatürk Bulv. Bahçelievler Mah. No:16/ 64 38280 Talas- KAYSERİ

Tel : 05386297330