



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL ALKOL ile OKSİDATİF STRES OLUŞTURULMUŞ SIÇAN
KARACİĞERİNDE EUGENOL'ÜN ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

EAYLETTİN ÖZTÜRK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
EYLÜL-2021



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL ALKOL ile OKSİDATİF STRES OLUŞTURULMUŞ SIÇAN
KARACİĞERİNDE EUGENOL'ÜN ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Eaylettin ÖZTÜRK
ORCID:0000-0002-4412-8087

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hasan YILDIZ
ORCID:0000-0001-5486-4005

HATAY
EYLÜL-2021

01.09.2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Eaylettin ÖZTÜRK

ÖZET

ETİL ALKOL ile OKSİDATİF STRES OLUŞTURULMUŞ SIÇAN KARACİĞERİNDE EUGENOL'ÜN ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan Öjenol maddesinin tek başına ve oksidatif stres etkeni (etil alkol) ile beraber tüketilmesi sonucu karaciğer hasarlanması ve oksidatif stres düzeyindeki etkileri değerlendirildi. Bu çalışmada, yaklaşık 310-390g ağırlığında 40 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele 10'arlı 4 gruba ayrıldı ve standart pellet tipi yem ile ad libitum olarak beslendi. 1. Grup (Kontrol grubu), diğer gruplar ile aynı stresi oluşturmak amacı ile 3ml/Sf/gün/gavaj, 2. Grup (Etil alkol grubu), %40'lık Etil alkol 3ml/gün/gavaj, 3. Grup (Öjenol Grubu), 50mg/kg/gün/gavaj, 4. Grup (Etil alkol+Öjenol grubu), %40'lık Etil alkol + 50mg/kg öjenol 3ml/gün/gavaj olacak şekilde 30 gün boyunca verildi. Çalışma sonunda sıçanlardan alınan kan, karaciğer ve böbrek dokularından biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı. Öjenol etil alkol ile beraber tüketildiğinde karaciğer üzerinde etanolün oluşturduğu hepatotoksisteyi anlamlı olarak azalttığı tespit edildi. Öjenol grubu sıçanlarda alkol grubu sıçanlara kıyasla AST, ALT, ALP, LDH ve TRİG seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (<0.05). BİLD, BİLT ve CHOL seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı (<0.05). Kaspaz 3 immuno histokimyasal boyamada karaciğer ve böbrek dokularının yaklaşık olarak tamamında sitoplazmik olarak boyama meydana gelmiştir. Karaciğer kontrol grubunun bazı preparatlarında sitoplazmik boyama görülmemiştir. Öjenol, etanol uygulaması sonucunda, oksidan-antioksidan dengesinin, oksidanların lehine değişmesini önlediğini söylemek mümkündür.

2021, 77 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan enzimler, Etanol, Karaciğer, Kaspaz-3, Öjenol.

ABSTRACT

INVESTIGATION of ANTIOXIDANT EFFECTS of EUGENOL on RAT LIVER FORMED with OXIDATIVE STRESS with ETHYL ALCOHOL

Liver damage and oxidative stress levels were evaluated as a result of consuming high antioxidant capacity of eugenol alone and with oxidative stress agent (ethyl alcohol). In this study, 40 Wistar albino female rats weighing approximately 310-390g were used. The rats were randomly divided into 4 groups of 10 and were fed ad libitum with standard pellet. Group 1 (Control group), 3ml / Sf / day / gavage to create the same stress as the other groups, Group 2 (Ethyl alcohol group), 40% Ethyl alcohol 3ml / day / gavage, Group 3 (Eugenol) group), 50mg / kg / day / gavage, Group 4 (Ethyl alcohol + Eugenol group), 40% Ethyl alcohol + 50mg / kg eugenol 3ml / day / gavage was given for 30 days. At the end of the study, biochemical, histopathological and immunohistological analyzes were performed on blood, liver and kidney tissue from rats. When eugenol was consumed together with ethyl alcohol, it was determined that significantly reduced the hepatotoxicity on liver that induced by ethanol. There was a statistically significant difference in AST, ALT, ALP, LDH and TRIG levels between the control and experimental groups (<0.05). No significant difference was found between the groups in BILD, BILT and CHOL levels (<0.05). In caspase 3 immunohistochemical staining, cytoplasmic staining occurred in almost all of the liver and kidney tissues. Cytoplasmic staining was not observed in some preparations of the liver control group. Eugenol prevented oxidant-antioxidant balance from changing with ethanol and oxidants in favor.

2021, 77 Pages

Key Words: Antioxidant enzymes, Ethanol, Liver, Caspase-3, Eugenol.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında; konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi, laboratuvar çalışmalarının yapılması ve tezimin yazımına kadar her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile bilimsel ve sosyal anlamda bana destek olan, büyük bir sabırla beni motive eden ve sağladığı destekler ile hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım danışman hocam, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi fen edebiyat fakültesi genel biyoloji anabilim dalı öğretim üyesi Dr. Hasan YILDIZ’a minnettarım.

Doktoraya başladığım ilk günden beri her konuda desteklerini benden esirgemeyen ve eğitimim süresince yegâne enerji kaynağım olan sayın hocam Prof. Dr. Birgül ÖZCAN’a müteşekkirim.

Her yanına gidişimde beni sabırla dinleyen, gece-gündüz demeden tecrübe ve desteklerini benden hiç esirgemeyen ve bana yol gösteren hocam Hüseyin DOĞRU’ya şükranlarımı sunarım.

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi patoloji anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Mehmet ZENGİN ve doktora öğrencisi Muharrem ATLI’ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan MKÜ Biyoloji Bölüm Başkanlığı’na, maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne (Proje No:18.D.008) ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim ve bu günlere gelmemi sağlayan canım eşim, kıymetli annem ve aziz babama sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Oksidatif Stress.....	3
1.1. Serbest Radikaller.....	4
1.2.1 Reaktif oksijen türleri (ROS)	6
1.2.2 Reaktif nitrojen türleri (RNS)	13
1.2.3 Reaktif Klorin Türleri (RCS)	14
1.2. Antioksidanlar	14
1.2.1. Endojen Antioksidanlar.....	15
1.2.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	19
1.4. Öjenol	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Deney Hayvanları.....	31
3.2. Deneysel Muamele ve Çalışma Yöntemi	31
3.3. Kan ve Doku Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	32
3.4. Biyokimyasal analizler	33
3.4.1. Homojenizasyon.....	33
3.4.2. Malondialdehid (MDA) Miktarının UV Spektrofotometre ile Tayini	34
3.4.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini	36
3.4.4. Süperoksit Dismutaz (Total) Enzim Aktivite Tayini	38
3.4.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini	41
3.4.6. Total Antioksidan Status (TAS) ve Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümleri.....	43
3.5. Histolojik Analizler	44
3.5.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi.....	45
3.5.2. İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi (Kaspaz 3)	45
3.6. İstatistiksel analizler	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Bulgular	47
4.2. Tartışma.....	58
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Reaktif Oksijen Türlerinin Etkilediği Moleküller	5
Çizelge 1.2.	Reaktif oksijen türleri (ROS).	6
Çizelge 1.3.	Reaktif nitrojen türleri (RNS).....	7
Çizelge 1.4.	Ekzojen Antioksidanlar.	19
Çizelge 1.5.	Antioksidanların / bitkilerin alkolik karaciğer hasarı üzerindeki etkileri. Yukarı ok (↑), artırma ve yukarı düzenleme, aşağı oklar (↓) ise azaltma ve aşağı düzenleme anlamına gelmektedir.	22
Çizelge 3.1.	MDA ölçümü için pipetleme miktarları.	35
Çizelge 3.2.	MDA stok standart çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda çözelti hazırlama.	36
Çizelge 3.3.	CAT ölçümü için kör ve numunelerin pipetlenme miktarları	37
Çizelge 3.4.	Assay reaktifinin hazırlanışı	39
Çizelge 3.5.	Amonyum sülfat çözeltisi, ksantin oksidaz çözeltisi ve bakır klorür çözeltilerinin hazırlanması.	39
Çizelge 3.6.	SOD aktivite tayini için pipetleme miktarları.	40
Çizelge 3.7.	GSH-Px aktivite tayini için pipetleme miktarları.	43
Çizelge 4.1.	Deney gruplarının ağırlık ortalamaları.	47
Çizelge 4.2.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının tam kan sayımı parametreleri ($p < 0,05$).	48
Çizelge 4.3.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının kan serumundaki bazı biyokimyasal parametreler ($p < 0,05$).	48
Çizelge 4.4.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının AST/ALT değerleri.	49
Çizelge 4.5.	BSA ile hazırlanan stok standart çözeltinin seyreltilme oranları.	50
Çizelge 4.6.	Karaciğer dokularında ölçülen protein miktarları ($p < 0,05$).	51
Çizelge 4.7.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku MDA Aktivitelerinin Karşılaştırılması ($p < 0,05$).	52
Çizelge 4.8.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku CAT Aktivitelerinin Karşılaştırılması ($p < 0,05$).	53
Çizelge 4.9.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku SOD Aktiviteleri ve Karşılaştırılması ($p < 0,05$).	53
Çizelge 4.10.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku GSH-Px Miktarları ($p < 0,05$).	53
Çizelge 4.11.	Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının kan serumundaki TAS ve TOS parametreleri ($p < 0,05$).	54
Çizelge 4.12.	Karaciğer ve Böbrek dokusundaki yarı istatistiki kaspaz-3 aktivite skoru	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Alkol metabolizmasının oksidatif yolları.....	2
Şekil 1.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminin kimyasal temeli.....	8
Şekil 1.3. Hidrojen peroksit, peroksil ve alkoksil radikallerinin kimyasal reaksiyonları.	11
Şekil 1.4. Antioksidan enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, Süperoksit Dismutaz (SOD; A), Katalaz (CAT; B) ve Glutasyon Peroksidaz (GPX; C).	17
Şekil 1.5. Öjenolün açık (2D) formülü.....	24
Şekil 4.1. Gruplar arasında ALT dağılımı.....	49
Şekil 4.2. Bradford Standart Grafiği	51
Şekil 4.3. MDA Standart Grafiği	52
Şekil 4.4. Kaspaz-3 aktivitesini gösteren karaciğer dokusu. Kontrol (A), Etanol (B), Öjenol (C), Etanol ve Öjenol (D) gruplarının aktivitesi.	55
Şekil 4.5. Hematoksilen Eozin ile boyanan karaciğer dokusu. Kontrol (A), Öjenol (B), Etanol (C), Etanol ve Öjenol (D) gruplarının Karaciğer histopatolojisi (H&E, X200). .	56
Şekil 4.6. Hematoksilen Eozin ile boyanan karaciğer dokusu. A; Etanol grubu sıçanların karaciğerinde gözlenen mikroveziküler yağ değişimi (yıldız işareti), (H&E, X200), B; Büyütülmüş bölge, yıldız işareti (H&E, X400)	56
Şekil 4.7. Böbrek dokusunda görülen Kaspaz-3 aktivitesi (A: Kontrol grubu 20X, B: Etanol Grubu 20X, C: Öj+Etanol grubu 20X, D: Öjenol 20X).	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

Öi.	:Öienol
Fe	:Demir
OD	:Optik Dansite
H ₂ O ₂	:Hidroien peroksit
ROO [·]	:Peroksil
LOO [·]	:Lipid peroksil
LOOH	:Lipid hidroperoksit
O ₂ ⁻	:Süperoksit
Eth	:Etanol
EthÖi	:Etanol ve Öienol

KISALTMALAR

ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
RNS	:Reaktif Nitrojen Türleri
BN	:Binükleat hücre
NEU	:Nötrofil hücreleri
HGB	:Hemoglobin,
MCV	:Mean Corpuscular Volume, Alvuvarların ortalama hücre hacmi
LYM	:Lenfosit hücreleri
MON	:Monosit hücreleri
EOS	:Eozinofilik lökosit hücreleri
PLT	:Kan pulcukları, trombositler
WBC	:Bevaz kan hücreleri, tüm lökosit hücreleri
AST	:Aspartat transaminaz veya AspAT / ASAT / AAT veya glutamik
ALT	:Alanin transaminaz, aynı zamanda alanin aminotransferaz olarak
ALP	:Alkalen Fosfataz
AFP	:Alfa-fetoprotein
BillD	:Direkt bilirubin
BillT	:Total bilirubin
LDH	:Laktat dehidrogenaz
TRİG	:Trigliserit
TOTAL Chol	:Total Kolesterol
TAS	:Kan serumu total antioksidan seviyesi
TOS	:Kan serumu total oksidan seviyesi
GGT	:Gama glutamil transferaz
CA125	:Kanser antijeni 125

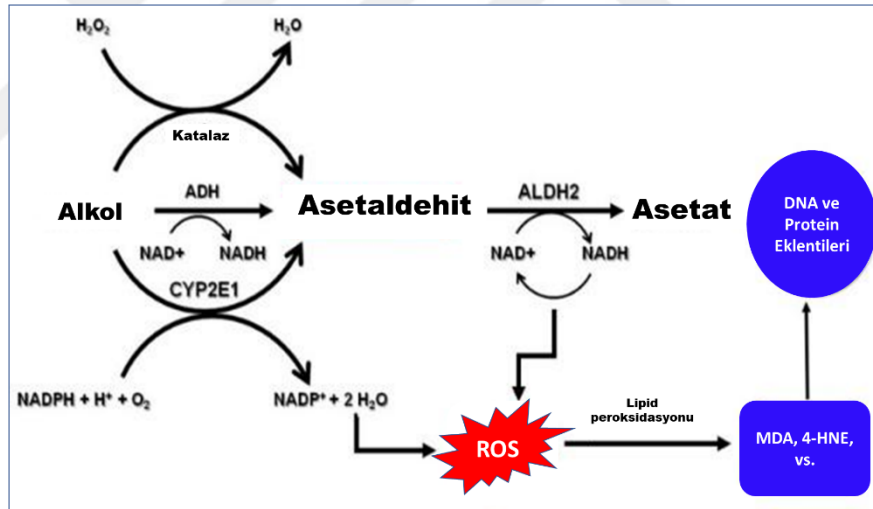
1. GİRİŞ

Eski zamanlardan bu yana alkolün rahatlatıcı etkisi insanlar tarafından keşfedilmiş ve çağlar boyunca tüketilmiştir. Dünya genelinde yaklaşık 2,3 milyar insan alkol kullanmakta olmasına karşın, alkolün beden sağlığımız açısından oldukça zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Dünya sağlık örgütünün (WHO) verilerine göre 2016 yılında, dünya çapında yaklaşık 3 milyon ölüme alkol kullanımının neden olduğu rapor edilmiştir. Bu da tüm ölümlerin % 5,3'üne tekabül etmektedir (WHO, 2018). Alkol kullanımı, alınan doza, süreye, bireysel dayanıklılığa, diyet ve diğer faktörlere bağlı olarak özellikle karaciğerde anlamlı, yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır.

Alkol metabolizması başlıca karaciğerde gerçekleşir dolayısı ile alkolle indüklenen oksidatif stres karaciğerde çok daha fazla etkindir (Galicía-Moreno ve ark., 2014). Karaciğerin alkol ile indüklenen toksisitesi, portal yolda bulunan yüksek alkol konsantrasyonuna ve etanol metabolizmasının metabolik sonuçlarına bağlıdır. Alkol etkisini, yıkım ürünü asetaldehite bağlı olarak, çeşitli mekanizmalarla ve en önemlisi lipit peroksidasyonu ve serbest radikal artışı yaparak göstermektedir (Pandaboina ve ark., 2012). Ağızdan alınan alkol, vücudun bütün sıvılarına kolaylıkla geçerken, emilimi, mide ve ince bağırsaktan yapılır. Karaciğer yanında beyin, böbrek, pankreas ve kalp olmak üzere birçok organda patolojik rahatsızlığa neden olmaktadır.

Bir dokudaki alkolün konsantrasyonu, o dokunun su içeriğine bağlıdır. Etanol kan yoluyla, su içeriğine bağlantılı olarak tüm dokulara ve vücut sıvılarına dağılır. Alkolün plazma proteinine bağlanma özelliği bulunmamaktadır. Vücut ağırlığının birim başına aynı alkol dozu, vücutlarındaki yağ ve su oranlarındaki büyük farklılıklar nedeniyle, farklı bireylerde çok farklı kan-alkol konsantrasyonlarına neden olmaktadır. Alkole bağlı karaciğer hastalığının gelişmesi kullanılan alkol miktarıyla doğrudan ilişkilidir ve gram (gr) ile ifade edilir. Yoğun ve düzenli alkol tüketimi alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığına neden olabilir. Kadınlar genellikle alkol için vücut yağ yüzdesi daha yüksek olduğundan erkeklerden daha küçük bir dağılım hacmine sahiptir (Frezza ve ark., 1990). Kandaki alkol konsantrasyonu, tüketilen alkolün miktarı, midede yemeğin varlığı veya yokluğu, mide boşalmasını etkileyen faktörler ve alkol oksidasyon oranına göre belirlenmektedir (Cederbaum, 2012).

Alkol vücutta esas olarak karaciğer tarafından metabolize edilir ancak beyin, pankreas ve mide de alkolü metabolize etmektedir (Vonlaufen ve ark., 2007). Bu dokulara ek olarak, alkol küçük miktarlarda gastrointestinal sistemde de metabolize edilir ve bu dokular asetaldehidin zararlı etkilerine maruz kalırlar (Seitz ve ark., 2007). Bilindiği gibi Asetaldehit, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından insanlara karşı Grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Şekil 1’de özetlendiği gibi, etil alkol, alkol dehidrojenaz yoluyla sitotoksik asetaldehit haline dönüştürülür ve daha sonra asetaldehit, fazla miktarda reaktif oksijen türüne (ROS) neden olan ksantin oksidaz veya aldehit oksidaz ile asetat haline oksitlenmektedir (Na ve ark., 2017). Tüm alkol dehidrojenazlar (ADH) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) izoenzimlerinin sınıfları (ADH1B, ADH1C ve ALDH2) esas olarak etanol metabolizmasında rol oynarlar. Bunun yanında az da olsa katalaz ve sitokrom P450 2E1 (CYP2E1)’ye bağlı etanol oksitleyici sistem bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Alkol metabolizmasının oksidatif yolları.

Besin olarak alkolün kalori değeri bulunmaktadır (gram başına 7 kalori içerir) ancak karbonhidrat ve yağ benzeri diğer moleküller gibi depolanamamakta ve elimine edilene kadar vücut sıvısında kalmaktadır (Cederbaum, 2012). Daha önce de belirtilen ve alkol metabolizması sonucu oluşan asetat, krebs döngüsü, elektron taşıma sisteminin aracılığıyla yağ asitlerinin sentezinde kullanılmaktadır. Bu yüzden ikincil enerji kaynağı olarak kullanılan yağların kullanımını engellenmektedir. Etanolün oksidasyonu,

nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)'ini indirgenmiş şekli olan NADH'ya dönüştürür. Yağların oksidasyonu için gerekli olan NAD'ın azalması yağ asitlerinin oksidasyonunu engeller ve hepatositlerde yağ birikimine sebep olur (Stewart, 2004). Etanol oksidasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS)'nin neden olduğu oksidatif stresin, alkol kaynaklı toksisitenin çoğunun patogeneğinde rol oynayan en önemli etken olduğu bilinmektedir. Bu serbest radikaller alkole bağlı karaciğer hasarı oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadır. ROS, yağ molekülleri (lipitler), proteinler ve DNA dahil olmak üzere hücrelerdeki temel kompleks moleküllere zarar verir veya tamamen bozulmasına (yani peroksidasyona) neden olabilir.

1.1. Oksidatif Stress

Oksidatif stres, serbest radikaller ve oksidanlar olarak adlandırılan reaktif metabolitlerin üretimi ve bunların antioksidan sistemler tarafından elimine edilmesi arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif streste artışı sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri, çift bağ yönünden zengin gruplardan hücre içi lipit, protein ve DNA'daki bazların çift bağlarına bağlanır. Bu bağın oluşumu ile bir hidrojen atomu koparılarak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Oksidatif strese sebep olan pek çok faktör vardır ancak; literatürde oksidatif stres genel olarak serbest radikallerle ilişkilendirilmiştir. Bu radikaller genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) kaynaklarıdır.

Yüksek reaktiviteye sahip moleküller olan reaktif oksijen türleri, başta mitokondri olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizmanın sonucu olarak veya iskemi-reperfüzyon, yoğun egzersiz, yoğun stres, yaşlanma, gebelik gibi fizyolojik haller, inflamasyon, radyasyon, kimyasal ajanlara uzun süre maruz kalma, yüksek oksijen basıncı, intoksikasyon, alkol tüketimi, sigara, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, diamin oksidaz, prostaglandin sentaz, guanil siklaz ve glikoz oksidaz gibi çeşitli enzimlerin aktivitesi ve antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri gibi sebeplere bağlı olarak üretilirler (Kwon ve ark., 2010; Özcan ve ark., 2015; Wickens, 2001). Fizyolojik konsantrasyonlarda ROS'ların vücutta pekçok görevleri vardır. Örneğin, sinyal molekülleri olarak işlev görürler, immünolojik yanıtta önemli rol oynarlar ve çeşitli hücre

aktivitelerinin (örneğin mitoz) düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar (Siwek ve ark., 2013). Aynı zamanda DNA metilasyonu yoluyla hafıza oluşumunda, hücrede mitokondrial respirasyonda, kanser hücrelerinin öldürülmesinde, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, intraselüler depolardan kalsiyum salınımında, tirozin amino asidini fosfatlama aktivasyonu ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonunda da rol oynamaktadırlar (Collin, 2019; Karabulut ve ark., 2016a). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda ROS'lar proteinler (enzimler, reseptörler), lipidler ve DNA dâhil olmak üzere birçok hücre bileşenlerinin zarar görmesine neden olur (Çizelge 1.1.). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar oksidatif stresin proinflatuar mekanizma ile kombinasyon halinde, yaşlanmaya bağlı bazı hastalıkların (Kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi) gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Devi ve ark., 2010).

1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip, reaktivitesi yüksek ve birçok metabolik ve patofizyolojik süreçte görev alan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller sahip oldukları ortaklanmamış elektronlardan dolayı çevrelerindeki atom ve moleküllere güçlü bir bağlanma isteği gösterirler. Elektronlarını çiftler halinde (eşleşmiş) bulunduran atomlar veya moleküller ise daha kararlı bir yapıya sahip olduğundan diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Eşleşmemiş elektronu bulunmayan ve diğer moleküller ile serbest radikallerden daha zayıf bir şekilde reaksiyona giren moleküller nonradikaller olarak tanımlanır (Phaniendra ve ark., 2015; Sifuentes-Franco ve ark., 2017).

Çizelge 1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkilediği Moleküller

Etkilenen Bileşikler	Etkiler
Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişimler Mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirlerinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hyaluronik asit	Sinovial sıvının viskozitesinde değişim

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller, endojen veya eksojen kaynaklardan üretilirler. Endojen kaynaklı serbest radikaller, iskemi, immün hücre aktivasyonu, enfeksiyon, aşırı egzersiz, kanser ve yaşlanma gibi durumlarda üretilirken, eksojen kaynaklı serbest radikaller ise hava ve su kirliliği, sigara kullanımı, alkol kullanımı, ağır veya geçiş metalleri; siklosporin, takrolimus, gentamisin ve bleomisin gibi bazı ilaçlar, asbest gibi endüstriyel çözücüler, pişirme (füme et, kullanılmış yağlar) ve elektro manyetik radyasyon gibi etkilerle üretilmektedirler (Dianzani, 1992; Ozsurekci ve ark., 2016).

Metabolizmada enerji üretimi için kullanılan oksijen, hem reaktif oksijen türlerinin hem de reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Böylece

vücudun normal oksijen kullanımı sırasında serbest radikallerin üretimi de mitokondri tarafından sürekli olarak yapılmaktadır. Biyolojik sistemlerde oksijen bazlı ve azot bazlı radikaller olmak üzere iki tip serbest radikaller bulunmaktadır. Çizelge 1.2.'de belirtildiği gibi reaktif oksijen türleri, süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerine ek olarak radikal olmayan hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve ozon olarak bilinmekte ve bunlar oksijenin metabolizması sürecinde oluşmaktadırlar. Reaktif nitrojen türleri ise Çizelge 1.3.'de belirtildiği gibi azot bazlı radikalleri ve radikal olmayanları içeren, azot dioksit, nitrik oksit radikalleri ve peroksinitriti içermektedir (Blanco ve ark., 2017; Karabulut ve ark., 2016a). Bunlarda uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz üzerinden nitrik oksit ve süperoksitten elde edilir (S. Li ve ark., 2015).

Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri (ROS).

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromoz asit	$HOBr$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	$LOO^{\cdot}$	Lipid hidroperoksit	$LOOH$

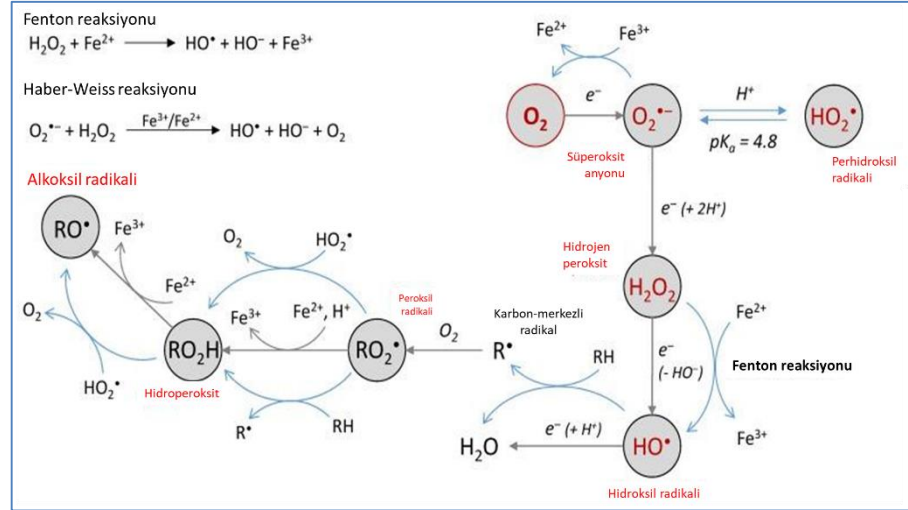
1.2.1 Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri fiziksel-kimyasal özellikleri hem termodinamik hem de kinetik açıdan iyi bilinen radikal türleridir. Endojen ROS üretiminin birincil kaynakları mitokondri, plazma zarı, endoplazmik retikulum ve peroksizomlardır. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine birincil üç radikal denir. Çünkü reaktif özelliklere sahip, oksijen içeren bileşiklerdir ve moleküler oksijenden arka arkaya bir elektron indirgeme aşaması sırasında üretilirler (Şekil 2).

Süperoksit ve hidroksil radikalleri organik substratlarla reaksiyona girebilir ve başka ROS üretebilen ara ürünlere yol açabilir. Örneğin hidroksil serbest radikalının C-H bağı üzerinden bir H atomunu çıkarması karbon merkezli bir radikalın oluşmasına neden olmakta bu radikal de O_2 ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek peroksil radikalini ($RO_2\cdot$) oluşturmaktadır. İkinci oluşan radikaller de yeni bir karbon merkezli radikal veya demir veya bakır gibi redoks tepkimelerinde görev alabilen metal katyonları tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile alkoksil radikaline ayrışabilen bir hidroperoksit ROOH vermek için başka bir substrat ile reaksiyona girebilir (Collin, 2019).

Çizelge 1.3. Reaktif nitrojen türleri (RNS).

Radikaller		Nonradikaller	
Nitrik oksit	$NO\cdot$	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	$NO_2\cdot$	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$



Şekil 1.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminin kimyasal temeli.

İkincil olarak oluşan bu radikal türlerin tümü ROS olarak kabul edilip, yapı ve reaktivite bakımından üç ana radikale (Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine) benzerlik göstermektedir.

a) Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) Radikali

Tüm aerobik hücrelerde süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi ile meydana gelir. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksitin üretimi çoğunlukla hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşir (Murphy, 2009). Elektron Taşıma Sisteminde (ETS) enerji dönüşümü sırasında az miktarda elektron kaçağı olmakta ve bu durum oksijenin $O_2^{\bullet -}$ serbest radikaline dönüşümüne neden olmaktadır. Süperoksit radikali oluşum yerinden fazla uzağa difüzenmez ve kendisi direkt olarak zarar vermez. Ancak moleküler düzeydeki etkinliği, sekonder olarak meydana getirdiği radikallerdir. Süperoksit radikali düşük pH da daha reaktiftir.

Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği

halde, ortamın pH'sına bağılı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir.

Süperoksitlerin faydalı etkileri de vardır, örneğin; nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise daha önce belirtildiği gibi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol almaktadır.

b) Hidroksil ($OH\cdot$) Radikali

Hidroksil iyonunun doğal formu olan Hidroksil radikali ($HO\cdot$) küçük, oldukça hareketli ve reaktif, suda çözünür, yarılanma ömrü çok kısa ve zararlı olan bir radikaldir. Hidroksil serbest radikali atmosferdeki kimyasalların ana oksitleyicisidir (Forster ve ark., 2007). O_2 'nin spontan ve enzimatik dismutasyonu hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olurken, H_2O_2 'in Fe^{2+} , Cu^+ ve Zn^+ gibi geçiş metal iyonları ile bir sonraki elektron indirgemesi hidroksil radikalının oluşumuna neden olmaktadır (Rác ve ark., 2015; Turrens, 2003). Bununla beraber canlı hücre yapılarındaki glikolipidler, fosfolipidler, kolesterol, karbohidratlar, proteinler, DNA gibi elektronca zengin birçok moleküle zarar veren, çok toksik ve tehlikeli bir radikal türüdür. Hidroksil radikali hücre zarlarındaki doymamış yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonuna, hücre ölümüne ve DNA üzerinde kırılmalara ve mutajenik etkilere neden olmaktadır (Ayala ve ark., 2014; Dröge, 2002).

c) Peroksil ($ROO\cdot$) Radikali

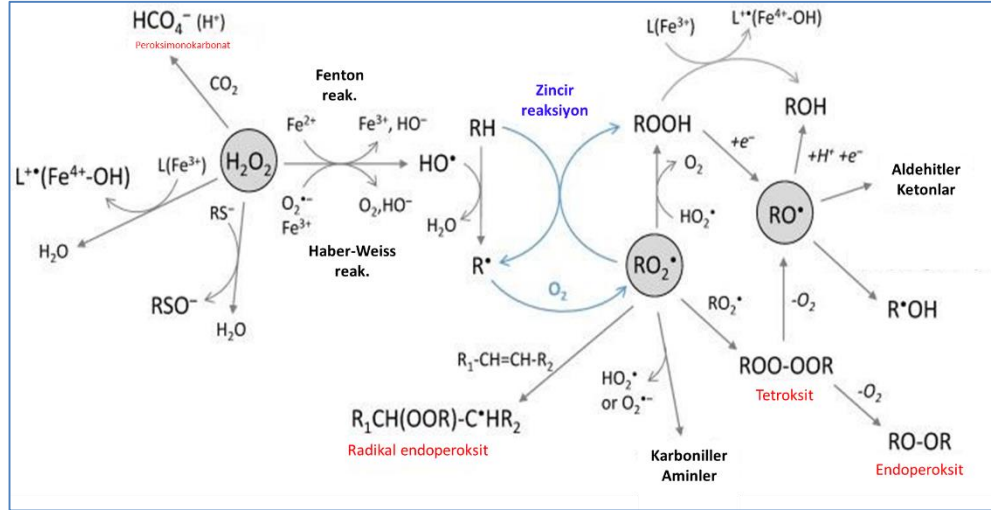
Peroksil radikalleri, karbon merkezli radikallere moleküler oksijen ilavesiyle üretilen ikincil radikal türleridir. Oksijen yokluğunda da hidroperoksitlerin dönüşümü ile üretilmektedirler. Peroksil radikalleri, hidroksil iyonuna göre daha az reaktiviteye sahiptir ancak çok sayıda biyolojik moleküller ile süperoksit anyonundan daha hızlı reaksiyona girer. Kısaca, karbon merkezli bir radikalın oksijenle reaksiyonu yoluyla

oluşur ve hücrel bileşenlere zarar verme olasılığı olan bir reaktiftir (Kwon ve ark., 2010). Aynı zamanda peroksi radikalleri, CO, CH₄ ve diğer organik bileşikler gibi atmosferdeki antropojenik ve biyogenik türlerin oksidasyonu ile de oluşmaktadır (Parker ve ark., 2009).

Peroksil radikalleri daha önce bahsedildiği gibi lipid peroksidasyonuna yol açabilmektedir. Lipid peroksidasyonu, oksil radikalleri, peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikal türlerinin, lipidlerden elektronları çıkardığı ve daha sonra başka reaksiyonlara girebilen reaktif ara ürünler ürettiği bir işlemdir (Su ve ark., 2019). Diğer ürünlerle birlikte, bu ara ürünler retro Diels-Alder mekanizması ile malondialdehit (MDA) üretirler. Peroksil radikalleri ROO• diğer peroksil radikalleri ile dimerizasyona uğrayabilir ve tetroksit türlerini de oluşturabilir. A vitamini, serbest karbon merkezli radikal eklentileri oluşturan peroksil radikalleri ile doğrudan etkileşime girebilir ve peroksidasyonu lipitlere yaymadan önce elektron transferi ile temizlerler (Rozanowska ve ark., 2005).

d) Alkoksil (RO•), Hidroperoksil (HO₂•) ve Lipid peroksil (LOO•) Radikali

Alkoksil (RO•) radikalleri Fenton reaksiyon işlemi sırasında R-OOH'ın indirgeyici bölünmeye uğramasıyla oluşmaktadır (Bang ve ark., 2014). Perhidroksil radikali olarak da bilinen hidroperoksil radikali (HO₂•), protonlanmış süperoksit formudur. Nitrik oksidi azot dioksite okside eder. Lipid peroksil (LOO•) radikali, doymamış yağ asitlerinin hidroksil radikali ile reaksiyona girerek lipid radikallerini meydana getirmesi ile başlar ve bu lipid radikalleri moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikallerini meydana getirmektedir (Shichiri ve ark., 2014).



Şekil 1.3. Hidrojen peroksit, peroksil ve alkoksil radikallerinin kimyasal reaksiyonları.

e) Nonradikal Reaktif oksijen türleri

- **Hidrojen peroksit (H₂O₂)**

Kendisi bir radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen türleri arasında kabul edilen önemli bir prooksidandır. Pro-oksidanlar, reaktif oksijen türleri üreterek veya antioksidan sistemleri inhibe ederek oksidatif strese neden olan kimyasallardır. Hidrojen peroksit molekülü meydana geldikten sonra katalaz enzimi tarafından oksijene ve suya hızla ayrıştırılır. Hidrojen peroksit hücre için toksik olarak kabul edilir. Örneğin, hücrelerin H₂O₂ ile inkübasyonu deoksiribonükleik asitlerde hasara neden olur, membran bozulmasına ve Ca₂⁺ bağımlı proteazlar ve nükleazların aktive olmasına ve hücrelerde Ca₂⁺ iyonlarının serbest bırakılmasına neden olur (Halliwell, 1991).

- **Hipokloröz asit (HOCl)**

Canlı sistemlerde, aktif nötrofillerin hücre içinde, inflamasyon sürecinde klorür iyonlarının miyeloperoksidaz enzim aracılı peroksidasyonu ile son ürün olarak hipokloröz asit üretilir ve ekstraselüler bölgeye salınarak bakterilerin yok edilmesinde katkıda bulunur (Sam ve ark., 2009). HOCl, periodontitis sürecinde Gram negatif patojenlere saldırma yeteneğine sahiptir. Yüksek HOCl konsantrasyonları, sitokinleri ve

büyüme faktörlerini düzenleyerek, klorlama veya oksidasyon yoluyla patojenleri öldürerek ve monositlerin nükleer faktör κB (NF- κB) ve aktivatör protein-1'i üzerindeki etkileri yoluyla iltihabı hafifletirerek iyileşmeyi desteklemektedir (Mainnemare ve ark., 2004). Her ne kadar HOCl ve HOBr üretimi, doğuştan gelen bağışıklık savunması olsada, biyomoleküllerdeki hipofaloz asit aracılı değişiklik ve inflamasyon bazlı hastalıkların gelişimi arasında bir korelasyonun olduğunu gösteren deneysel klinik çalışmalar mevcuttur (Ximenes ve ark., 2015).

- **Hipobromoz asit (HOBr)**

Birincil oksidanlar bazen, sırasıyla eozinofil-peroksidaz veya mileoperoksidaz gibi eozinofile ve nötrofile bağlı peroksidazlar yoluyla ikincil oksidanların üretimine yol açabilir. Bu peroksidazlar, halid iyon varlığında, hidrojen peroksidi hipokloroz aist (HOCl) ve hipobromoz asit (HOBr) gibi reaktif halojen türlerine dönüştürür. HOBr, patojen hücrelerinin birçoğunu öldürebildiği için oksitleyici ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerde gereğinden fazla üretildiği durumlarda toksik etki göstererek apoptozise yol açmaktadır (Wagner ve ark., 2004).

- **Singlet oksijen (1O_2)**

Singlet oksijen, oksijenin fotokimyasal, termal, kimyasal veya enzimatik aktivasyonu ile elektronlardan birinin dönüş yönünü değiştirerek, tekli oksijen oluşturmak için diğeriyle eşleşmesi sonucu oluşmaktadır. Singlet oksijen, esasında bir serbest radikal olmayıp, bazı serbest radikal reaksiyonları sırasında oluşabilir ve serbest radikallerin oluşumunu tetikleyebilir (Aldred ve ark., 2009; Ghosh ve ark., 2018). Ömrü çok uzun değildir ve oldukça hızlı bir şekilde geri dönüşmekte veya bu zaman zarfında çevresindeki moleküllerle etkileşerek ortamı etkilemektedir. Singlet oksijenin aşırı miktarlarda oluşumu, oksidatif stresi indükler ve lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonuna bağlı kanserojen ve toksik etkiler gösterir (Agnez-Lima ve ark., 2012).

- **Ozon O_3**

Ozon gazı (O_3), 3 oksijen atomundan meydana gelen ve atmosferin üst katmanlarında yer alan renksiz bir gazdır. Yapılan çalışmalarda ozonun biyolojik sistemdeki antikoklar tarafından da üretilebileceği yönündedir. Ozon bir serbest radikal değildir ancak güçlü bir oksidasyon kapasitesi vardır. Ozon dioksijene parçalanınca bir oksijen serbest radikali meydana getirmektedir. Biyolojik sistemlerde yağlar, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girebilme kabiliyetinden dolayı hücreye ve dokuya zarar verebilmektedir (Sciorsci ve ark., 2020; Wen ve ark., 2020).

1.2.2 Reaktif nitrojen türleri (RNS)

RNS neredeyse tamamen oksijen içeren türler olduğundan dolayı, tanımı gereği ROS olarak da sınıflandırılabilirler. Örneğin, peroksinitrit bir ROS veya RNS olarak sınıflandırılabilir (Gonçaves ve ark., 2020). Reaktif azot türlerinin aşırı üretimi “nitrosatif stres” olarak tanımlanır. Bunlar proteinlerin yapısını değiştirip onların normal fonksiyonlarını inhibe eden nitrozilasyon reaksiyonlarına yol açar.

a) Nitrik oksit (NO) Radikali

Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gaz olan NO, yüksüz bir molekül olduğundan hücre membranını kolayca geçerek demir ve/veya sülfür içeren proteinlere ve protein olmayan moleküllere bağlanır. Nöron ve düz kas hücre membranındaki guanilat siklazı aktive eden NO, damar dilatasyonu, sinirlerden uyarı geçişi gibi fonksiyonları gerçekleştirir (Aladağ ve ark., 2000; Ignarro, 2014; Wilson ve ark., 2009).

b) Nitrojen dioksit (NO_2) Radikali

Nitrojen dioksit diğer radikallerle çeşitli reaksiyonlara giren reaktif bir azot türüdür. Düşük seviyelerde endojen olarak üretilen nitrojen dioksitin biyolojik sonuçları son zamanlarda dikkate alınmaya başlanmıştır. Bu radikal, hücre zarları ve hidrofobik protein

alanları gibi daha az polar ortamlarda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu ortamlarda lipit peroksidasyonunu başlatabilir, nitratlanmış lipitler üretebilir ve amino asitleri, özellikle sistein, triptofan ve tirosini oksitleyebilir. Yaralı dokularda ve çeşitli hastalıklı hücrelerde, protein-tirosil radikallerinin azot dioksit ile rekombinasyonu, nitratlanmış proteinleri oluşturmaktadır (Ignarro, 2014; Kamm ve ark., 2019). Azot dioksit, akciğerlerin hassas bölgelerine derinlemesine nüfuz edebilir ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına (KOAH), çeşitli solunum hastalıklarına, amfizem ve bronşite neden olabilir veya durumun ağırlaşmasına sebep olabilir (Saki ve ark., 2020).

1.2.3 Reaktif Klorin Türleri (RCS)

Reaktif klor türleri (RCS) terimi, klor içeren reaktif türleri ifade eder, ROS ve RNS ile karşılaştırıldığında, RCS terimi biyoloji ve tıpta daha az araştırma konusu olmuştur (R. Li ve ark., 2016). ClO , Cl_2^- , ve ClO_2 gibi reaktif türler atıkların bozunmasında uygulama olanakları göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda bu radikaller, tuzlu su arıtımı için ümit verici oksidanlar olarak kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2020; Wu ve ark., 2016).

1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, okside olabilen bir maddenin oksidasyonunu geciktirebilme veya önleyebilme yeteneğine sahip olan maddelerdir. Canlı sistemlerde oksidanların ve antioksidanların gücü denge halindedir ve oksidanların yeterinden fazla oluşması ya da antioksidanların yetersiz kalması durumunda, ileri hücre hasarı dâhil pekçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanlar, serbest radiklerin zararlı etkilerini gidererek hücreleri koruyan savunma mekanizmalarıdır. Yapılarına, kaynaklarına, çözünürlüklerine ve yerleşimlerine göre farklı olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Doğada, doğal ve sentetik olan birçok antioksidan çeşidi mevcuttur. Endojen antioksidanlar enzimatik etkili ve enzimatik olmayan olmak üzere farklı tipte bileşenleri içermektedir (Barbosa ve ark., 2020). Endojen enzimatik antioksidanlar, glutatyon

peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz ve hidroperoksidaz iken enzimatik olmayan antioksidanlar ise ürikasit, lipoik asit, bilüribin, glutatyon, ferritin. Koenzim Q, glutatyon ve melatonindir (Reiter ve ark., 2016; Rizzo ve ark., 2010; Valko ve ark., 2006). Endojen oksidanların yetersiz kalması durumunda dışardan alınan antioksidanlar da devreye girmektedir. Ekzojen antioksidanlar, karotenoidler, vitamin E, A ve C, doğal flavonoidler veya diğer farklı bileşiklerdir. Sentetik antioksidanlar, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), oktil gallat (OG), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), propil gallat (PG) ve tert-butilhidrokinon (TBHQ) içeren petrol merkezli antioksidanlardır (Neha ve ark., 2019). Sentetik antioksidanların çoğu gıda endüstrisinde lipit oksidasyonunu geciktirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Lü ve ark., 2010).

Antioksidanlar etkilerini farklı yollarla gerçekleştirebilmektedir;

- **Toplayıcı ve giderici etkilerini**, oluşan serbest radikalleri kararlı hale getirmek ve bağlamak için kullanırlar,
- **Zincir kırıcı etkilerini**, kendilerini serbest oksijen radikallerine bağlayıp onların zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engellemek suretiyle gerçekleştirirler,
- **Baskılayıcı etkilerini**, reaksiyon hızını azaltarak gerçekleştirirler,
- **Onarıcı etkilerini**, lipit, protein ve DNA gibi makro moleküllerde meydana gelen biyolojik moleküler hasarı onararak gerçekleştirirler,
- **Enzimatik etkilerini**, canlılardaki antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak, kullanırlar.

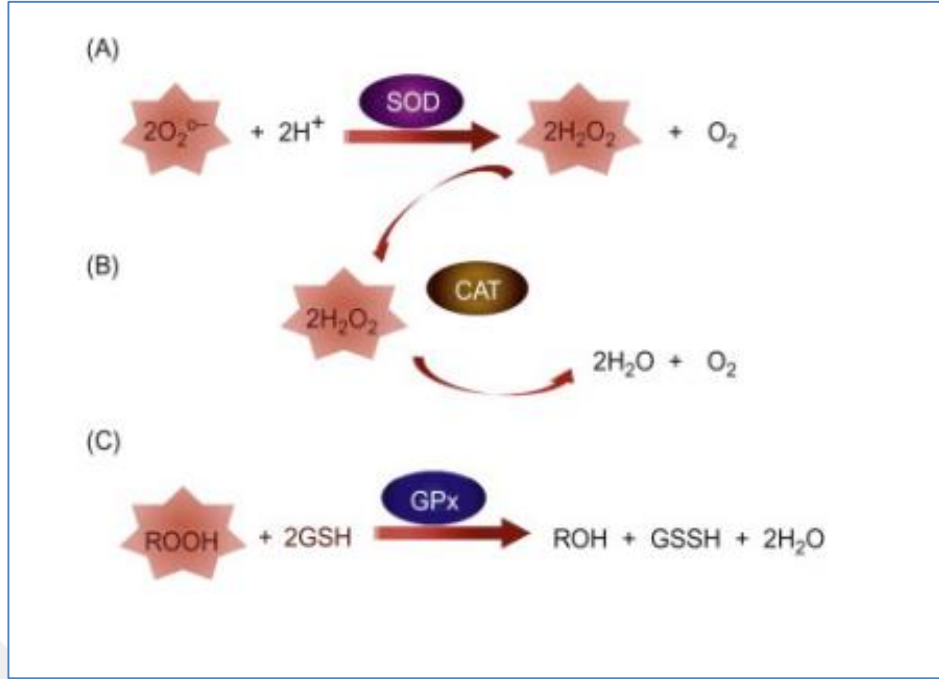
1.2.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar genel olarak enzimatik etkili olan ve enzimatik etkili olmayan antioksidanlar olarak iki şekilde incelenirler.

1.2.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Oksidasyona karşı savunmada önemli rol oynayan ve enzimatik etkili antioksidanlar sınıfında başlıca süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz (Mit-STO) yer almaktadır.

- **Süperoksit dismutaz (SOD):** Reaktif oksijen türlerine karşı öncelikli savunma oluşturan antioksidan proteinlerden biridir. Süperoksit dismutaz, zararlı süperoksit radikalini (O_2^-), moleküler oksijen'e (O_2) ve hidrojen peroksit'e (H_2O_2) katalizleyen enzimatik etkili antioksidandır. Ortamda oluşan zehirli hidrojen peroksit katalaz veya GPx yardımı ile ortamdan uzaklaştırılır (Şekil 4). SOD, süperoksit anyonunun oksijene ve hidrojen peroksit'e dönüştürerek süperoksit anyonu temizleyen, böylece peroksinitrit üretimini ve daha fazla hasarı önleyen tek antioksidan enzimdir. Genel olarak bütün aerobik hücrelerde SOD enzimi bulunur. Hücre içerisinde hem sitozolde ve diğer organellerde (Cu/Zn SOD) hem de mitokondride (Mn SOD) bulunur. Hücre dışında ekstraselüler süperoksit dismutaz (EC SOD) olarak bulunur. Dokulara oksijen sağlanması ile SOD aktivitesinde artış meydana gelir. SOD enzimi normal fizyolojik koşullarda fagosite edilmiş bakterilerin yok edilmesinde görev alır ve inflamatuvar yanıtta önemli rol oynar (Karabulut ve ark., 2016b; Young ve ark., 2001).



Şekil 1.4. Antioksidan enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, Süperoksit Dismutaz (SOD; A), Katalaz (CAT; B) ve Glutatyon Peroksidaz (GPX; C).

- **Katalaz (CAT):** Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi ortadan kaldırır. Yapısında hem içeren bir enzim olup hem peroksizomlarda hem de sitozolde bulunur. Hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya indirgenmesinden sorumludur (Akkuş, 1995; Seven ve ark., 1996).
- **Glutatyon peroksidaz (GSH-Px):** H_2O_2 düzeyi düşük miktarda ise GSH-Px tarafından katalizlenir. Ayrıca organik hidroperoksitleri ortamdan uzaklaştırır. Glutatyon peroksidaz tetramerik yapıda bir enzim olup hücre içinde sitoplazmada bulunur. Yapısında dört adet selenyum (Se) atomu yer alır. Özellikle fagositik hücrelerde solunum patlamasında görev alır. GSH-Px, lipid peroksidasyonunu önler ve de lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar (Seven ve ark., 1996). GSH-Px enzim aktivitesinde azalma hücre hasarı ile sonuçlanır.
- **Mit-STO:** Oksijen taşıma zinciri içinde suya indirgenirken elektron kaçaqlarını önleyerek $\text{O}^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{OH}^{\cdot}$ salınımını engeller.

- **Glutasyon redüktaz (GR):** İndirgenmiş glutasyonun yüksek seviyelerde tutulması için önemlidir. Prüdin nükleotid içeren flavo enzimdir. Flavoprotein yapısındaki glutasyon redüktaz, NADPH ile birlikte hücre içinde bulunan ve antioksidan savunmada rol alan, okside glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyona dönüşümünde rol alır. Glutasyonun indirgenmiş formda bulunması hücre içerisinde mevcut olan antioksidan enzimin aktivitesinin sürdürülebilmesi için önemlidir. Özellikle GSH-Px ve katalaz aktivitelerin eş zamanlı meydana gelebilmesi için hücre içerisinde sürekli bulunması gerekmektedir. Bunun dışında, selenyum seviyesindeki azalış da GSH-Px ve glutasyon redüktaz aktivitelerinde bozulmaya yol açar. Glutasyon redüktaz enziminin eksikliği özellikle oksidatif strese karşı yüksek duyarlılığı olan eritrositlerin H_2O_2 'yi detoksifiye etmesinde yetersizliğe ve sonuçta ve eritrosit fragilitesinde artışa yol açar (Seven ve ark., 1996).

- **Gultasyon S transferaz (GST):** Toksik metabolitler ile GSH'ın konjuge olmasını katalizleyerek metabolitlerin detoksifikasyonu gerçekleştirir. Eksojen olarak alınan veya endojen reaksiyonlar sonucunda oluşan toksik bileşikler glutasyon ile konjuge edilerek ya da GST ile katalizlenen reaksiyon yoluyla daha hidrofilik (suda çözünen) bileşiklere dönüştürülür ve safra veya idrar yoluyla atılırlar. GST'nin ayrıca lipit hidroperoksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizmasında rol aldığı ileri sürülmüştür (Seven ve ark., 1996).

1.3.1.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Başlıca enzimatik olmayan antioksidanlar ve bunların sahip olduğu özellikler şu şekildedir: **Glutasyon**, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve H_2O_2 'yi detoksifiye eder ya da singlet oksijen ($1 O_2$) ve hidroksil radikalini temizler. **Albümin**, yapısında bulunan sistein sayesinde hidroksil radikalini süpürebilir ve HOCl'u ortamdan temizler. **Melatonin**, singlet oksijen, nitrik oksit, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, gibi reaktif türleri ve serbest radikallerin farklı formlarını temizler. **Ürik asit**, benzer şekilde birçok serbst radikali etkisizleştirir. Lipit peroksidasyonu engelleyerek koruyucu olarak görev yapabilir. **Bilirübin**, Peroksil peroksil radikallerini etkileyerek zincir kırıcı etki gösterir. **Transferrin**, ferrik haldeki demir iyonlarını (Fe^{3+})bağlar. **Seruloplazmin**, bakır

iyonlarını bağlar (%95) ve çoklu doymamış yağ asitlerini aktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korur. **Koenzim Q10**, indirgenmiş formu olan Ubikinol, elektron vererek, oksidanları nötralize ederek etkili bir antioksidan aktivitesi gösterir. Böylece toksik özellikteki çoğu ROS'lara karşı etkin bir savunma sağlar. Bunların yanında miyogloblin, selenyum, N-asetil sistein, metiyonin, kaptopril vb. gibi antioksidanlarda mevcuttur (Karabulut ve ark., 2016b; Özel ve ark., 2014).

1.2.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanları, vitamin eksojen antioksidanlar ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olarak (Çizelge 1.4.) iki grupta sınıflandırabiliriz (Karabulut ve ark., 2016b).

Çizelge 1.4. Eksojen Antioksidanlar.

Eksojen Antioksidanlar	
Vitamin Eksojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar
α -Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
β -karoten (Vitamin A)	Rekombinant süperoksit dismutaz
Askorbik asit (Vitamin C)	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
Folik asit (Vitamin B9)	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) Nötrofil adezyon inhibitörleri Sitokinler (TNF ve IL-1) Barbitüratlar

Kortikosteroidler, antiviral ve immünsüpresan ajanlar gibi karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlar ciddi hepatik hasara kadar olumsuz etkilere yol açabilmektedir (El-Newary ve ark., 2017).

Bazı doğal ürünlere ek olarak (sarımsak, yeşil çay, üzüm, ceviz vb.), L-theanine, E vitamini, N-asetil sistein, raksofelast ve betain gibi bileşiklerin de oksidatif stresin ortadan kaldırılmasındaki rolleri için birçok araştırma yapılmıştır (S. Li ve ark., 2015). Bazı doğal ürünlerin oksidatif stresle ilişkili hepatik alkolik hasar üzerindeki etkileri Çizelge 1.5.'te özetlenmiştir. Bu çalışmalar anti-oksidatif tedavinin alkolik karaciğer hasarını azaltmak için umut verici bir yöntem olduğunu gösterir. Bu nedenle karaciğer hastalığının tedavisi için daha etkin ve güvenli ajanların bulunması fenolik bileşiklerin yanı sıra, gelecekte daha spesifik biyoaktif bileşikler daha fazla tanımlanmalı ve izole edilmelidir.

Apoptoz, hücrelerde bazı morfolojik özellikler ile kendini gösteren, enerjiye bağlı gerçekleşen ve hücrenin kendi dinamikleri ile faaliyete geçirilen programlanmış bir hücre ölüm şeklidir.

Apoptozis hücrenin organizmanın hücre sayısını sabit tutmak veya hasara uğramış hücrele parçalarının yeniden kullanılmasına yönelik meydana gelen hücresel bir Geri Dönüşüm olayı olarak ifade edilebilir. Ergin bireylerin dokularında ve embriyolojik gelişimde kendini gösterebilen apoptozis, eski veya hasarlı hücrelerden yeni ve sağlıklı hücre dönüşümünün ilk aşamasıdır. DNA hasarı oluşması durumunda, hasarın meydana geldiği hücre apoptoz ile ortadan kaldırılır. Bu sayede hücre hasarının veya mutasyon sebebiyle DNA hasarı sonucu kanserleşmenin önüne geçilmesi hedeflenir. Kaspazların birden çok türü mevcut olduğu bilinmektedir. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Normal döngüye sahip bir hücrede inaktift halde bulunurlar, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazlar 3 ana gruba ayırmak mümkündür:

- a- Başlatıcı; (Kaspaz 2,8,9,10),
- b- Efektör (Kaspaz 3,6,7),
- c- İflamatuar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

DNA onarımı ve replikasyonunda görevli enzimleri bloke ederler. Hücre iskeletini oluşturan proteinlerin zincirlerini keserek, apoptozun aktive edilmesini ve sonrasında DNA'nın tek ipliğinde çok karakteristik ve geri dönüşümü olmayan bir parçalanma şeklinde etkilerini gösterirler (Coşkun ve ark., 2011).

Çalışmamızda alkol tüketiminin hücrelerde bir hasara yol açıp açmadığı, alkolün hücreleri apoptozise yönlendirip yönlendirmediği hücrelerdeki kapaz-3 seviyesinin miktarı ile anlaşılmaya çalışılmıştır.



Çizelge 1.5. Antioksidanların / bitkilerin alkolik karaciğer hasarı üzerindeki etkileri. Yukarı ok (↑), artırma ve yukarı düzenleme, aşağı oklar (↓) ise azaltma ve aşağı düzenleme anlamına gelmektedir.

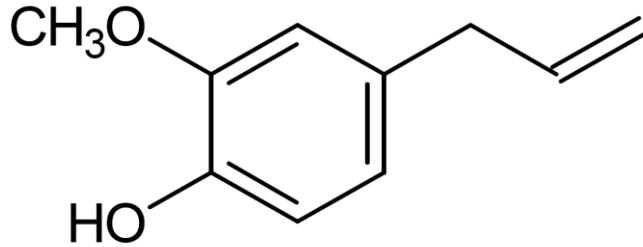
Model	Materyal	Etkisi	Doz	Biyoaktif bileşik	Kaynak
Sıçanlara etanol diet uygulanmıştır	Yeşil çay	↑ Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar; ↓ lipit ve protein oksidasyonu	Lieber-DeCarli diyeti 7 g/L etanol ile uygulanmıştır	Epicatechin, epicatechin gallate	(Chrostek ve ark., 2005)
Sıçalara etanol uygulanmıştır	<i>Ziziphus mauritiana</i> (hünnap) yaprağı	↓ ALT, AST, ALP, total bilirubin; ↑ GSH-Px, Glutasyon redüktaz, katalaz ve SOD.	200 ve 400 mg/kg b.w.	Tannin, saponin ve fenolik bileşikler	(Dahiru ve ark., 2007)
Sıçanlar etanole subkronik olarak maruz kalmıştır	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> (horoz ibiği) tohumları	↓ MDA, AST, NADPH; ↑ Cu, Zn-SOD	140 g/kg	Total fenoller	(Lucero López ve ark., 2011)
Farelerde akut alkol ile oluşturulan karaciğer yaralanması	<i>Hovenia dulcis</i> (Japon kuru üzüm ağacı) sapı	↓ ALT, AST, MDA; ↑ SOD, GSH-Px	100, 350 ve 600 mg/kg b.w.	Nişasta içermeyen polisakkaritler	(Du ve ark., 2010)
Sıçalara etanol uygulanmıştır	<i>Hammada scoparia</i> yapraklarının metanolik ekstraksiyonu	↓ Aminotransferase, glycogen synthase kinase-3 β, lipid peroxidation; ↑ GSH-Px	200 mg/kg b.w.	Fenolik bileşikler	(Bourogaa ve ark., 2013)
Farelerde kronik alkol ile oluşturulan karaciğer yaralanması	Jujube honey	↓ Lipoprotein oxidation, AST, ALT, MAD, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; ↑ GSH-Px	27 and 54 g /kg b.w.	Fenolik asit	(Cheng ve ark., 2014)

Çizelge 1.5. (Devam) Antioksidanların / bitkilerin alkolik karaciğer hasarı üzerindeki etkileri. Yukarı ok (↑), artırma ve yukarı düzenleme, aşağı oklar (↓) ise azaltma ve aşağı düzenleme anlamına gelmektedir.

Model	Materyal	Etkisi	Doz	Biyoaktif bileşik	Kaynak
Farelerde alkol ile oluşturulan hepatoksisite	Dondurularak kurutulmuş, filizlenmiş ve fermente edilmiş maş fasulyesi	↑ Antioxidan düzeyi, NO	200 ve 1000 mg/kg b.w.		(Ali ve ark., 2013)
Sıçanlarda kronik alkol uygulaması	Sızma zeytin yağı	↓ Transaminases düzeyi, hepatic lipid peroksidasyonu; ↑ GSH-Px, SOD ve CAT	Diyet ile beraber %5 (wt/wt)	Tokoferoller,Klorofil ve total polifenoller	(Kasdallah-Grissa ve ark., 2008)

1.4. Öjenol

Öjenol (Eugenol) ismi *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, karanfil) bitkisinden ileri gelmektedir. Karanfil tüm dünyada en çok sevilen ve kullanılan baharatlardan bir tanesidir. Kendine has koku, tat ve aromaya sahip olması, aynı zamanda vücut için gerekli olan vitaminler, mineraller ve diğer besin elementlerini içeriğinde bulundurması sebebi ile yüzyıllardan beri mutfak ve tıp alanlarında kullanılan bir baharat çeşidi olmuştur. Öjenol, karanfil özütünün büyük bir kısmını oluşturmakta ve bu bitkinin antioksidatif öğelerinden de bir tanesidir. Renksiz, soluk sarı, yağlı bir görünüme sahip ve karanfile karakteristik kokusunu verir. Öjenol, allylbenzene sınıfının bir üyesi ve molekül ağırlığı 164.20 g/mol'dür. Kapalı formülü $C_{10}H_{12}O_2$ şeklindedir, açık formülü ise Şekil 5.'te gösterilmiştir (Kamatou ve ark., 2012). Öjenol, alkolde veya yağda kolayca çözünmektedir ancak suda kısmen çözünmektedir (NCBI, 2018). Öjenol yaklaşık 44 ten fazla isimle anılmakta olup bazı isimleri, “4-allyl-2-methoxyphenol, 4-allyl-2-methoxy-phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol, 2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)-phenol ve 1-Hydroxy-2-Methoxy-4-β-propenylbenzol” şeklindedir (TOXNET, 2018).



Şekil 1.5. Öjenolün açık (2D) formülü.

Öjenol karanfilin tomurcuklarından, kök ve yapraklarından izole edilebilmektedir. Doğada en çok (%80-90 oranında) karanfil yağında bulunmaktadır (Tripathi ve ark., 2016). Bunun yanında, Defne (*Pimenta racemosa*), Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.), Tarçın (*Cinnamomum tamala*), Hindistancevizi (*Myristica fragrans*), Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.), Fesleğen (*Ocimum gratissimum*), Japon anasonu (*Illicium anisatum*, Japanese star anise) gibi bitkilerde de farklı oranlarda varlığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Bennett ve ark., 1988; Dighe ve ark., 2005; Howes ve ark., 2009; Johnson

ve ark., 1999; Lopes-Lutz ve ark., 2008; Pragadheesh ve ark., 2013; Ueda-Nakamura ve ark., 2006).

Öjenol ve türevleri üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar anestezi, analjezik, antimikrobiyal, antioksidan, antifungal, antienflamatuar ve antikonvülsan, antikanserojenik, antimutajenik, itici (kovucu) ve antifumigant özelliklerinin olduğunu göstermiştir. Bu özelliklerinden dolayı tıp, farmakoloji, diş bakım endüstrisi, kozmetik, gıda, tarım ve aktif ambalaj malzemelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevre ve çalışma grubunun (EWG) kozmetik ve kişisel bakım veri tabanı listesinde 379 kadar ürünün içeriğinde farklı konsantrasyonlarda öjenol olduğu bildirilmiştir (EWG, 2018).

Defne (*Laurus türleri*) dahil olmak üzere çok çeşitli bitkilerde ve karanfil yağında bulunan öjenol, karanfil yağında ağırlıklı olarak 4-alil-2-metoksifenolden oluşur, ancak aynı zamanda az miktarda asetil 4-alil-2-metoksifenol içerir. 4-Alil-2-metoksifenol, çoğu böcek türü için güçlü bir caydırıcıdır, ancak birkaç durumda cezbedici olabilir. Farklı ticari isimler altında çok sayıda farklı tedarikçi tarafından satılmakta olup büyük ölçekli zirai kullanımından ziyade ev bahçesi pazarına yönelik uygulama alanı bulmaktadır. 4-Alil-2-metoksifenol tahriş edicidir ve dikkatli kullanılmalıdır. Doğal olarak oluşan bitki bazlı bir fenolik olduğundan, hedef olmayan organizmalara veya çevreye zararlı olması beklenmez (Gonzalez-Coloma ve ark., 2010).

Dişi Wistar albino sıçanları kullanılarak yapılan bir çalışmada, asetik asitle indüklenen ülser modeli üzerinde, günde iki kez, yedi veya on dört gün öjenol (1, 10 veya 100 mg/kg) uygulanmıştır. Bu çalışmaya göre, ülserli bölgede makroskopik, mikroskopik ve biyokimyasal analizler yapılmış olup, 7 veya 14 gün uygulanan öjenol (1 mg/kg) mide iyileşme sürecini sırasıyla % 33 ve % 52 hızlandırmış olduğu görülmüştür. Öjenolün iyileştirici etkisine, histolojik yapıdaki düzelme ve süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin normalleşmesinin eşlik ettiği görülmüştür. Ayrıca öjenol (1 mg/kg) mide mukozal miyeloperoksidaz aktivitesini düşürdü ve münin salgılanmasını arttırmıştır. Bunun tersine, 7 gün süreyle uygulanan 100 mg/kg'lık bir dozda öjenol ülserli alanı % 49 arttırdığı, ancak 10 mg/kg'lık dozda 7 veya 14 günlük tedaviden sonra ülser alanını değiştirmedeği görülmüştür. Bu nedenle öjenolün mide iyileştirme potansiyeli açık olmasına rağmen, yüksek dozlarda kullanılmasıyla mide lezyonunun kötüleşmesi

nedeniyle uygulamasının yeterli dozda yönetilebilir olması gerekmekte olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Longo ve ark., 2021).

Abdel-Wahhab ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada, *S. aromaticum* yağı ve *Nigella sativa* yağının, oksidatif strese neden olan aflatoksinlere maruz kalan erkek sıçanları hepato ve nefrotoksisiteye karşı önemli ölçüde koruduğunu göstermişlerdir (Abdel-Wahhab, 2005). Halder ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada karanfil yağının etkisi sonucu oksidatif streste azalma ile beraber kısa ve uzun vadede skopolaminin neden olduğu hafıza ve öğrenme eksikliklerini geri döndürebileceği sonucuna varmıştır (Halder, 2011).

Bu çalışmalar, oksidatif stresin neden olduğu zararlı etkilerin tedavisinde karanfilin zengin bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda; etkili antioksidan kapasitesine sahip olduğu bilinen öjenolün tek başına ve oksidatif stres etkeni (etil alkol) ile birlikte tüketilmesi sonucu oluşan karaciğer hasarlanması ve oksidatif stres miktarındaki değişiklikleri incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Alkol kullanımına bağlı olarak çok fazla serbest oksijen radikallerinin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Albano, 2006). Reaktif yapıda olan serbest radikaller yörüngelerindeki serbest elektronlarını çiftlemek üzere canlı hücrelerde bulunan diğer moleküller ile reaksiyona girerek moleküllerin yapılarını değiştirme eğilimindedirler. Genel olarak antioksidan sistem hem serbest radikallerin oluşumunu engellemekte hemde hücrenin hayati bileşenlerine etki etmeden önce ortamdan uzaklaştırmasını sağlamaktadırlar (Sies, 1997). Aynı zamanda reaktif oksijenler birçok hücresel fonksiyonda görev almaktadırlar ve antioksidan sistemin amacı bunları tamamen ortadan kaldırmak yerine optimum seviyede tutmaktır (Rhee, 2006).

Canlı yapısında yaygın olarak üretilen Reaktif Serbest Radikaller, Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller olup (ROS) serbest radikallerin toksik etkilerinin sebep olduğu birçok hastalığın varlığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu hastalıkların başında; iskemi reperfüzyon hasarı, epilepsi, diyabetes mellitus, kanser, yaşlanma ve kas hastalıkları gelmektedir (Buldak ve ark., 2014; Maffei ve ark., 2011). Ayrıca fazla bu serbest radikaller, beyin dokusunda nekroz ve benzeri patojenik etilere yol açabilmektedir (Eşmekaya ve ark., 2011). Örneğin beyinde oluşan oksidatif stres, beyin dokusuna zarar vererek Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli sinir sistemi hastalıklarının oluşmasına neden olabilmektedir (Christen, 2000; Nunomura ve ark., 2006; Wood-Kaczmar ve ark., 2006).

Ağızdan alınan alkol, vücudun bütün sıvılarına kolaylıkla geçebilir ve emilimi mide ve ince bağırsaktan yapılır. Vücuda ağız yoluyla alınan alkol yemek borusu, mide ve sonrasında ince bağırsaklara ulaşır. Alınan alkolün neredeyse tamamı ince bağırsaklardan emilerek portal yolla karaciğere ulaşır. Karaciğer, organizmaya giren alkolün büyük bir bölümünün metabolik olarak işlev gördüğü organdır. Karaciğer başta detoksifikasyon olmak üzere, kırmızı kan hücrelerinin ve bazı maddelerin yıkımı, protein ve hormonların sentezi ve glikojenin depolanması gibi geniş bir etki alanına sahiptir (Guan ve ark., 2015). Serbest oksijen radikallerinin karaciğerde albümin sentezi ve hemostaz üzerine olan etkileri ve hatta hepatosellüler kanser gelişimi gibi patojenik etkileri olduğu düşünülmektedir (Dede ve ark., 2011).

En önemlileri karaciğer enzimleri, aminotransferazlar (AST ve ALT) ve alkalen fosfataz olarak kabul edilmektedir ancak bu testler karaciğere ait bir fonksiyonun ölçüsü olmamakla birlikte bu testler, karaciğer hastalığının tanımlanmasında, ayırıcı tanısında ve prognozunun belirlenmesinde önemlidir. Hiçbir parametre karaciğer fonksiyonlarını ifade etmekte tek başına kullanılamaz. Bu nedenle ALT, AST, ALP (alkalen fosfataz), GGT (gama-glutamil transpeptidaz), 5'NT (5'nukleotidaz), total ve direkt bilirubin, albümin ve protrombin zamanı gibi değerlerin bir arada yorumlanması gereklidir. Karaciğer fonksiyon testlerini başlıca ikiye ayırmak gerekirse;

- 1- Bilier Obstrüksiyon Testleri; Serum bilirubini (BillT ve BillD), serum alkalen fosfatazı (ALP), 5'-nukleotidaz, gamma glutamil transpeptidaz (GGT),
- 2- Hepatosellüler Hasar Testleri; (Aspartat aminotransferaz (AST) ve Alanin aminotransferaz (ALT) olarak ikiye ayırmak mümkündür.

Doğan ve arkadaşları, etil alkolün sebep olduğu oksidatif stres sonucu olarak MDA ve serum enzimlerinin arttığını belirtmişlerdir (Dogan ve ark., 2011). Akut ve kronik alkol tüketiminin, pankreas ve karaciğere ait parametrelerde oksidatif strese yol açtığını belirtmişlerdir (Rakonczay ve ark., 2003). Aktaş, etil alkolün akut subkronik ve kronik uygulamaları sıçanların serum enzim seviyelerinde (ALT, AST, LDH, GGT, ALP) önemli artışlara sebep olduğunu bildirmiştir (Aktaş, 2014). Pari ve Suresh, yapmış oldukları çalışmalarda alkolik karaciğer hastalığının ilerlemesinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını bildirmişler (Pari ve ark., 2008). Etanolün sıçan karaciğerlerinde meydana getirmiş olduğu tahribata bağlı olarak, karaciğer harabiyet göstergesi olan serum enzimlerinin seviyelerinde artışa neden olduğunu, ayrıca etanolün sebep olduğu oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikal üretiminin göstergesi olarak lipid peroksidasyonun son ürünü malondialdehit tüm dokularda artarken, birçok dokuda antioksidan savunma sistemi biyobelirteçlerinde dalgalanmalara sebep olduğunu belirtmişlerdir (Yurt ve ark., 2011).

Bütün bu etkilerin yanı sıra histopatolojik olarak bazı hasarlar da gözlemlenebilmektedir. Bu durum karaciğer hepatositlerinde genellikle yağlanma olarak kendini gösterebilmektedir. Karaciğer yağlanması yaygın olarak bilinmeyen sebeplerin yanı sıra obezite ve diyabet gibi bazı durumlarla da ilişkilendirilmektedir. Hepatositlerde

yağ birikimi birikimi (esas olarak trigliseritler, fosfolipitler ve kolesterol esterleri) steatoz olarak karakterizedir.

Rezveratrol, şizandra üzümü ve kurutulmuş *P. orientalis* (Doğu çınarı) yapraklarının, etanolün neden olduğu karaciğer yağlanması ve oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Doğan ve ark., 2019 ; Park ve ark., 2014 ; Szkudelska ve ark., 2017). Slukvin ve arkadaşları, çalışmalarında alkolik karaciğer tahribatının, karaciğerde yağ birikmesi (steatosis) ve hepatik iltihabın oluşumunu tetiklediğini bildirmişlerdir (Slukvin ve ark., 2001)

Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemi, organizmanın doğal savunma sistemini oluşturur. Karaciğer hücrelerinde oksidatif hasara karşı antioksidan etki gösterebilen enzim sistemleri de bulunmaktadır. Bu endojen enzimatik antioksidanlar, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, mitokondrial sitokrom oksidaz ve hidroperoksidazdır. Das ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, etanol ile oluşturulan oksidatif strese yeşilbiberin (*Capsicum annum*) karaciğerde koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Etanol grubunda ALT, AST, ALP, TNF- α , IL-6, LPO, Cu-Zn-SOD, GST, GPx, TG, CHLS, LDL seviyeleri artarken, HDL, Mn-SOD, CAT, GSH, GR ve G6PD seviyelerinde de azalış olduğunu belirtmişlerdir. Yeşilbiberin etanol ile birlikte uygulanması, doza bağlı bir şekilde yukarıdaki parametrelerdeki değişiklikleri hafiflettiğini ve ayrıca hücrelerinin apoptotik ölüm sayısını azalttığını belirtmişlerdir (Das ve ark., 2018). Diğer bir çalışmada ateştopu bitkisinin (*Hammada scoparia*) karaciğeri koruyucu etkisini incelemişler ve sıçan karaciğerinde etanolün neden olduğu oksidatif stresi önlediğini, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yeniden kazanılması konusunda etkili olduğunu bildirmişlerdir (Bourogaa ve ark., 2014).

Allam ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmalarında *Astragalus kahiricus* (Fabaceae) köklerinin (etanol öztütünün) etanol kaynaklı karaciğer apoptozisine karşı karaciğeri koruyucu aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir. Karaciğer histopatolojik incelemesi ile doğrulanan kaspaz-3 aktivasyonuna ve DNA parçalanmasına karşı anti-apoptotik etkiler gösterdiğini belirlemişlerdir (Allam ve ark., 2013).

Shukri ve arkadaşları, streptozotosin kaynaklı diyabetik sıçanlarda yaptığı karanfil uygulamasında antioksidan enzim seviyelerini geri yükleyerek kan şekerini ve lipid oksidasyonunu düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada karanfil yağının göz merceğinde hiperglisemiye bağlı oksidatif doku hasarını ve katarakt oluşumunu inhibe

ettiği ve şeker hastalarında karanfilin in vivo antioksidatif organ koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (Shukri ve ark., 2010).

Bu proje ile ilk olarak, dñnya genelinde kullanılan ve önemli derecede toksikasyonlara neden olan etil alkolñ ve yüksek antioksidan özelliğe sahip olan Eugenolñ sıçan karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkileri araştırılacaktır. İkinci olarak ise, bu maddenin etil alkol ile birlikte kullanımı ile rat karaciğer antioksidan sistemi üzerinde ne gibi değişikliklere neden olduğu biyokimyasal ve histolojik olarak incelenecektir.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan sıçanlar Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (HMKÜ-DAM) tarafından sağlanmış olup 28.12.2017 tarih ve 2017/12-2 sayılı etik kurul belgesi ile gerekli onay alınmıştır. Çalışmada, 12-16 haftalık, yaklaşık 310-390gr ağırlığında, her grupta 10 adet rat olacak şekilde (4 Grup) 40 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, uygun kafeslerde; 12 saatlik aydınlık-karanlık periyotlu ortamda, ortam sıcaklığı 20-24 °C ve nem oranı %40-50 olacak şekilde barındırılmıştır. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup çalışma süresince etik kurallara uyulmuştur. Çalışma süresince sıçanlar standart pellet tipi yem ile *ad libitum* olarak beslendiler. Sıçanların beslenmesi ve bakımı yine aynı laboratuvarında, günlük olarak her sabah yapıldı. Ayrıca, sıçanların gelişimlerinin kontrolü ve sağlıklı sıçanları ayırımı için kontroller her uygulama öncesi tüm sıçanlara uygulandı.

3.2. Deneysel Muamele ve Çalışma Yöntemi

Sıçanlar eşit sayıda (n=10) ve rastgele 10'arlı dört gruba ayrılmıştır. Gruplar; Kontrol grubu, Etil alkol grubu, Öjenol grubu ve Etil alkol ve Öjenol grubu olacak şekilde düzenlenmiştir.

a) Kontrol grubu: Hayvanlar standart rat yemi ile 4 hafta kısıtlama olmadan (*ad libitum*) beslendi. Diğer gruplar ile aynı stresi oluşturmak amacı ile gavaj ile 3ml fizyolojik su verildi.

b) Etil alkol (Eth) grubu: Hayvanlar 30 gün boyunca standart rat yemi ile kısıtlama olmadan (*ad libitum*) beslendi ve Etil alkol (%40'lık, 3ml/gün olacak şekilde) gavaj yolu ile verildi.

c) **Öjenol (Öj) grubu:** Hayvanlar 30 gün boyunca standart rat yemi ile kısıtlama olmadan (*ad libitum*) beslendi ve Öjenol 50mg/kg bw olacak şekilde gavaj yolu ile verildi.

d) **Etil alkol ve Öjenol (EthÖj) grubu:** Hayvanlar 30 gün boyunca standart rat yemi ile kısıtlama olmadan (*ad libitum*) beslendi ve etil alkol+Öjenol (%40'lık 3ml Etil alkol ve 50mg/kg bw Öjenol olacak şekilde) her gün gavaj yolu ile verildi.

Öjenol materyali, %99 saflıkta öjenol ticari firmalardan temin edildi (Sigma-Aldrich Co., USA). Çalışma süresi boyunca gerekli olan karışım her gün taze olarak hazırlandı. Gavaj için hesaplanan öjenol miktarı, steril ılık suda vortex cihazı yardımıyla homojen karıştırılıp hayvan uygulaması yapılmıştır. Bu işlem her gavaj öncesinde tekrarlanıp öjenolün homojen dağılımı sağlanmaya çalışılmıştır. Etil alkol materyali, sıçanlarda oksidatif stres oluşturmak amacıyla kullanılan saf etanol ticari firmalardan temin edildi (Sigma-Aldrich Co., USA) ve %40 olacak şekilde distile su ile karıştırılarak her gün taze olarak hazırlandı.

3.3. Kan ve Doku Örneklerin Alınması ve Saklanması

Çalışmada, otuzuncu gün sonunda fiziksel muayene ve tartımdan sonra ketamin/ksilazin anestezisi altında enjektörler yardımıyla kalplerinden kan alındı ve karaciğer dokuları toplandı.

Tam kan sayımı için EDTA'lı mor kapaklı tüpler kullanıldı ve analizleri hemen yapıldı. Biyokimyasal analizler için kanlar sarı kapaklı vakumlu plastik jelli tüpler kullanıldı ve pıhtılaşmanın ardından 4000 rpm, 15 dakika, +4°C'de santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılarak analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Karaciğer dokuları ise çıkarıldıktan sonra serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) su ile yıkanarak ikiye bölündü ve yarısı histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehite konularak fiksasyon işlemine tabi tutuldular, diğer yarısı oksidatif stres parametrelerine bakılmak üzere sıvı azot içine alınarak -80°C'de saklandı. Böbrek dokuları ise çıkarıldıktan sonra serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) su ile yıkanarak ikiye bölündü ve yarısı histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehite konularak fiksasyon işlemine tabi tutuldular.

3.4. Biyokimyasal analizler

Kandan tam kan sayımı yapılmıştır ve kan serumundan, AST, ALT, ALP, BillD, BillT, LDH, Trig, Total Chol, TAS ve TOS parametreleri incelenmiştir. Karaciğerden ise, MDA, SOD, GSH-PX, CAT enzimleri seviyesi belirlenmiştir.

- Tam kan sayımı: Tam kan sayım otoanalizatörü (Mindray, BC-6800) kullanılarak yapılmıştır.

- Kandan AST, ALT, ALP, BillD, BillT, LDH, Trig, Total Chol, TAS ve TOS tayini yapılmıştır. Bunun için, biyokimya ve hormon otoanalizörleri (Advia-1800 ve Centaur XP) kullanılmış ve fotometrik olarak ölçülmüştür.

3.4.1. Homojenizasyon

Derin dondurucuda (-80°C) bekletilen sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak buz üzerinde çözünmeleri sağlandı. Dokuların homojenizasyonu için gerekli tampon çözelti ve hazırlanışı;

A Solüsyonu Hazırlanışı: NaH_2PO_4 ten 6,805 gr alındı 1000 ml distile su ile tamamlandı.

B Solüsyonunun Hazırlanışı: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17,907 gr alınıp 1000 ml ye distile su ile tamamlandı. A ve B solüsyonu aşağıda belirtilen miktarlarda karıştırıldı ve pH:7.00 olacak şekilde ayarlandı.

Final tampon çözeltisi: 413 ml A Solüsyonu + 587 ml B Solüsyonu (pH:7.00).

Karaciğer dokuları tartıldı, ağırlıkları kaydedildi. Tampon miktarı doku ağırlığının 9 katı olacak şekilde hesaplandı (Doku ağırlığı x 9). Tartılan doku homojenizasyon yapılacak tüplere alındı, ilk önce hesaplanan tamponun yarısı koyularak soğuk zincirde homojenizasyon işlemine başlandı. İki dakika homojenize ettikten sonra tamponun diğer yarısı eklendi, doku tamamen homojenize olana kadar homojenizasyon işlemine devam edildi. Elde edilen homojenatların 700 μL si MDA ve homojenat protein tayinleri yapılmak üzere ependorflara porsiyonlanarak -80°C 'de saklandı. Elde edilen homojenatların kalan kısmı 3220 rpm'de 40 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerin süpernatantları porsiyonlanarak -80°C 'de saklandı. Ayrılan süpernatantların

bir kısmı ile CAT, GSH-Px ve kalan kısım SOD enzim aktivite tayini için etanol-kloroform fazı oluşturmak üzere -80 ° C’de saklandı.

SOD aktivite ölçümü için porsiyonlanmış süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortexlenip cam tüpte 3220 rpm / 40 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.4.2. Malondialdehid (MDA) Miktarının UV Spektrofotometre ile Tayini

MDA tayini: Doku supernatantlarında MDA analizleri, lipid peroksidasyonun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)’in reaksiyonu sonucu oluşan renkli bileşik absorbansının 535 nm’de ölçümüne dayalı spektrofotometrik yöntemle (Wasowicz ve ark., 1993) belirlenmiştir. Çift kaynatma esasına dayalı yöntemde, ilk kaynatmada proteinlere bağlı olan MDA’nın serbestleşmesi için proteinler çöktürülür; ikinci kaynatmada total MDA, TBA ile sıcak ve asidik ortamda reaksiyona girer ve renkli kompleks oluşturur. TBA-MDA’nın oluşturduğu renkli kompleks, 532 nm dalga boyunda MDA konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak absorbans verir.

Kullanılan reaktifler

TCA’ nın hazırlanması: 10g %10’luk trikloroasetikasit (TCA) alındı 100 ml distile suya tamamlandı.

TBA’nın hazırlanması: 0,675g %0,675’lik tiobarbitürik asit (TBA) alındı 100ml distile suya tamamlandı.

Deneyin yapılışı

MDA tayini yapmadan önce vidalı cam tüplere grup isimleri ve numaraları yazıldı; tüpler 90 °C benmaride 15 dakika inkübasyona maruz kalacağı için yazılar su buharı nedeniyle silinmeyecek şekilde yazıldı.

1. MDA tayini için kör tüpüne 500 µl distile su, numune tüpüne ise 500 µl numune (homojenat) eklendi.

2. Daha sonra herbir numunenin üzerine önceden hazırlanmış olan TCA çözeltisinden 2500 µl eklendi ve vortekslendi. Vorteksin ardından hemen ağzı vidalandı ve daha önce hazırlanmış 90°C benmariye yerleştirilerek, 15 dakika inkübasyon yapıldı.

3. Inkübasyonun ardından tüpler soğuk suyla soğutuldu. Tüpler soğuduktan sonra kapaklar çıkartılarak; tüplerin ağzı parafilmlenerek 3000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi.

4. Santrifüj aşaması bittikten hemen sonra tüpler sarsılmayacak şekilde çıkartılıp parafilmli açıldı.

5. Daha sonra herbir numune için önceden hazırlanmış diğer vidalı tüplere ekstrakt edilmiş tüplerden çökeleğe dokunmadan süpernatant kısmından 2 ml pipetlenip aktarıldı.

6. Daha sonra kör ve numune tüplerine 1'er ml önceden hazırlanmış olan TBA'dan eklendi.

7. Eklemeden sonra tüm tüpler hızlıca vortekslenip tekrar 90 °C benmaride 15 dakika inkübe edildi, inkübasyon esnasında numunelerin hafif turuncu; inkübasyon sonunda ise yavruağzı rengine döndüğü izlendi. Ardından tüpler benmariden çıkartılıp soğutuldu. Son olarak spektrofotometre ile 532 nm dalga boyunda fotometrik ölçüm yapıldı. Körden başlamak suretiyle yapılan ölçümde körün absorbanı sıfırlanıp kör tüpü spektrofotometreden çıkarıldı ve diğer tüplere sırasıyla fotometrik ölçüm yapıldı. Çıkan absorban değerleri kaydedildi.

Çizelge 3.1. MDA ölçümü için pipetleme miktarları.

	Kör tüpü	Numune Tüpü
%10'luk TCA (mL)	2500 µl	2500 µl
Numune (mL)	-	500 µl
Distile su (mL)	500 µl	-

Standart Eğri Çizimi

MDA stok standartından (1,1,3,3 tetramethoksiopropan) 10 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart çözelti hazırlandı. Eğri çizimi için hazırlanan günlük

standart çözeltiden distile su ile 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/8 oranlarında seyreltme yapılarak 7.5, 15, 30, 60, 75 nmol/ml derişiminde çalışma standartları hazırlandı. Her standarda deney prosedürü içinde bir örnek gibi muamele edildi, ölçülen absorbanlardan ve bilinen konsantrasyonlardan yararlanılarak standart grafiğı oluşturuldu.

Çizelge 3.2. MDA stok standart çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda çözelti hazırlama.

Dilüsyon	1/80	1/40	1/20	1/10	1/8
Konsantrasyon	7.5nmol/ml	15nmol/ml	30nmol/ml	60nmol/ml	75nmol/ml
Stok çözelti	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
dH₂O	7900 µl	3900 µl	1900 µl	900 µl	700 µl
Toplam hacim	8000 µl	4000 µl	2000 µl	1000 µl	800 µl

Hesaplama

Standart grafiğinden elde edilen formülden yararlanılarak MDA miktarları belirlendi. Sonuçlar protein miktarına oranlandı.

3.4.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivite Tayini

CAT (CAT, EC 1.11.1.6) tayini: Doku supernatantlarında CAT analizleri ise, Aebi tarafından belirtilen metot ile doku homejenatlarından 30 saniye süre boyunca substrat H₂O₂'nin dekompozisyon oranının 240nm'de spektrofotometrik olarak izlendiğı yönteme göre yapılmıştır (Aebi, 1984).

Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorban verir. Ortama sonradan ilâve edilen H₂O₂, katalaz tarafından su ve oksijene dönüştürölür ve ultraviyole spektrumda absorban azalmasına yol açmaktadır. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin spesifik aktivitesi ile doğru orantılı olarak seyretmektedir. CAT enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon şu şekildedir:



Kullanılan reaktifler

Fosfat tamponunu daha önceden homojenizasyon için hazırlanan pH: 7,00 olan fosfat tamponudur.

H₂O₂ Çözeltisinin hazırlanışı

H₂O₂ çözeltisi; 240 nm'deki absorbansı 0,500'e ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponudur.

- 1) Spektrofotometre 240 nm fotometrik ölçüme ayarlandı.
- 2) 300 mL pH: 7,00'lık, 50 mM fosfat tamponu ışık geçirmeyen reaktif şişesin aktarıldı.
- 3) Reaktif şişesindeki fosfat tamponuna 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilâve edildi.
- 4) Spektrofotometrede 2. küvete H₂O₂ ilave edilmemiş fosfat tamponu koyuldu, kör absorbansı alındı ve sıfırlandı. Ardından H₂O₂ çözeltisinin absorbans ölçümü yapıldı. Optik Dansite (OD) 0.500 oluncaya kadar H₂O₂ ilavesine devam edildi.

Enzim aktivitesinin kinetik ölçümü

Pipetleme, 2990 µl H₂O₂ Çözeltisi üzerine 10 µl ölçümü yapılacak numune (örnek süpernatantı) pipetlendi; çözelti hızlıca karıştırıldı, kuvartz küvete aktarılarak kinetik okuma başlatıldı.

Çizelge 3.3. CAT ölçümü için kör ve numunelerin pipetlenme miktarları

	Fosfat tamponu	H ₂ O ₂ çözeltisi	Numune (µl)
Kör tüpü	3000	-	-
Numune tüpü	-	2990	10

- 1) Spektrofotometre 240 nm'de kinetik ölçüm yapacak ve 60 saniye boyunca 5 saniye aralıklarla ışın gönderecek şekilde ayarlandı.
- 2) Spektrofotometrede 2. kısma içerisinde yalnızca fosfat tamponu (kör) bulunan küvet konularak, absorbans sıfırlandı; küvet kinetik ölçüm boyunca bu kısımda sabit

tutuldu. 1. kısımda ise sırasıyla numunelerin kinetik ölçümü yapıldı. Absorbans azalışı bir dakika boyunca izlendi ve absorbanstaki değişimler kaydedildi.

Hesaplama

Hesaplamada aşağıdaki formül kullanıldı;

$$k = \{[2,3 \times \log (OD1/ OD2)] / \Delta t (sn)\}$$

OD1: Başlangıçta ölçülen optik dansite

OD2: Bir dakika süre sonunda ölçülen optik dansite

Δt : Ölçüm süresi (1 dakika)

k: Katalaz için hesaplanan 1. derece katsayısı

Daha sonra çıkan değer aynı süpernatandaki protein konsantrasyonuna oranlandı.

$$k/mg \text{ protein} = k / [(mg/mL \text{ protein}) \times 1000]$$

3.4.4. Süperoksit Dismutaz (Total) Enzim Aktivite Tayini

SOD (EC 1.15.1.1) tayini: Doku supernatantlarında SOD analizleri, ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgemesinin, SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanan yöntemle ölçülmüştür (Durak ve ark., 1993).

Ekstraktın Hazırlanması

SOD aktivite tayini için süpernatanda ayrı bir ekstrakt fazı oluşturuldu. Oluşturulan ekstrakt fazından yine süpernatant kısmı alındı ve SOD aktivitesi süpernatantın süpernatantında ölçüldü.

Ekstrakt fazı oluşturmak için, Kloroform (3V) / etanol (5V) karışımı hazırlandı. (Kloroform + etanol) / numune V/V oranlarında karıştırıldı. Ependorflara grup ismi ve numarası yazıldı. Her tüpe etanol/kloroform karışımından 400 µl koyuldu, üzerlerine 400 µl numune pipetlenerek vortekslendi. Vorteksin ardından hazırlanan ekstrakt 3220 rpm de

+4 °C’de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj bittiğinde ependorflar çöken kısmın hareket edip süpernatana karışmaması için yavaşça sarsılmadan çıkartıldı.

Assay Reaktifinin Hazırlanması

İlk olarak ışık geçirmeyen bir reaktif şişesi hazırlandı çünkü assay reaktifinin hazırlanmasında kullanılan ksantin ışığa duyarlıdır. Aşağıdaki Çizelgede belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Assay reaktifinin hazırlanışı

Kimyasal adı	Kullanılacak miktar	Distile su (ml)
0,3 mmol/L Ksantin	4,565	100
0,6 mmmol/L EDTA (2 Na tuzu)	12,5	50
150 umol/L NBT	6,13	50
400 mmol/L Na ₂ CO ₃	1270	30
1 g/L Bovin serum albumin (BSA)	15	15

Hazırlanan her bir kimyasal çözeltisi koyu renk cam şişeye köpürtülmeden aktarılmış, 5’i birleştirilerek assay reaktifi hazırlanmıştır.

Ksantin Oksidaz (XO) hazırlanması: Ksantin oksidaz enzim çözeltisi için alüminyum folyolu bir tüp hazırlandı. İnsulin iğnesi yardımıyla şişe ters çevrilerek alınan XO daha önce hazırlanmış ve folyolu tüpe aktarılmış olan soğuk 2M çözeltisininiçerisine aktarıldı. Her numune için 50µl çözelti gerekli. Çalışmada 2,5ml XO çözeltisi hazırlandı. Öncelikle 0,66 gr 2M (NH₄)₂SO₄, 2,5 ml distile suda çözündü alüminyum folyolu tüpe aktarılarak dolapta soğutulduktan sonra üzerine 25 µl XO pipetlendi ve 2-8 °C’de bekletildi.

Çizelge 3.5. Amonyum sülfat çözeltisi, ksantin oksidaz çözeltisi ve bakır klorür çözeltilerinin hazırlanması.

2M (NH ₄) ₂ SO ₄	Distile su (ml)
--	-----------------

Amonyum sülfat	0,66 gr	2,5
0,66 gr amonyum sülfat 2,5 ml soğuk distile su içerisinde çözülür ve buz dolabında bekletilir.		
	Ksantin oksidaz enzimi	Amonyum sülfat çözeltisi
XO enzim çözeltisi	25 ul	2,5 ml
2,5 ml soğuk amonyum sülfat çözeltisi içerisine 25 ul XO enzimi pipetlenir ve buzdolabında bekletilir.		
	0,8 mmol/L	Distile su
Bakır klorür çözeltisi	5,4 mg	50 ml
5,4 mg bakır klorür 50 ml distile suda çözülür ve 0,8 mol/L çözelti hazırlanmış olur.		

Deneyin Yapılışı

Numune ve kör tüpleri hazırlandı; 3 ayrı kör tüpü hazırlandı. Her bir numune tüpüne ve kör tüplerine 2,85ml assay reaktifi konuldu. Numune tüplerinin üzerine 100 µl ekstraktın supernatanından eklendi, körlere ise 100 µl distile su eklendi; hemen ardından vortekslendi. Ardından herbir kör ve numune için 50 µl soğuk XO çözeltisi eklenir, hızlıca vortekslenir. Bu işlemlerden sonra 25 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sona erdiğinde kör tüpleri mor-menekşe rengi alırken numune tüplerinde daha açık mor renk gözlemlendi.

Renk değişiminin devam etmemesi ve absorbansın sağlıklı çıkması için hazırlanan CuCl₂ çözeltisi ile reaksiyon durduruldu. Bunun için CuCl₂ çözeltisinden 1ml kör ve numune tüpleri üzerlerine hızlıca eklenerek ardından vorteks yapıldı. CuCl₂ eklemesi bitince spektrofotometrik ölçüme geçildi.

Çizelge 3.6. SOD aktivite tayini için pipetleme miktarları.

	Kör (ml)	Numune (ml)
Assay reaktifi	2,85	2,85
Örnek süpernatantı	-	0,10
Bidistile su	0,10	-
XO çözeltisi	0,05	0,05

Kör tüpüne enzim ilâvesinin ardından vortekslenir ve inkübasyon süresi başlatılır.

25 °C'de 20 dakika inkübasyonun ardından hızlıca CuCl₂ ilavesi ile reaksiyon durdurulur.

Spektrofotometrik Ölçüm

Spektrofotometre fotometrik ölçüm için 560 nm dalga boyuna ayarlanarak, havaya karşı sıfırlandı. Distile suya karşı körden başlanarak sırayla körler ve numuneler için 560 nm'de fotometrik ölçüm yapıldı, absorbanslar kaydedildi.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

NBT indirgenmesini % 50 inhibe eden SOD enzim aktivitesi bir SOD ünitesi olarak adlandırılır. SOD aktivite tayininde sonuçlar doku için; U/mg protein şeklinde gösterilir.

$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune (AN)}] / \text{Absorbans kör (AK)} \times 100.$

% 50'lik inhibisyon 1 U olarak kabul edildiğinden;

$\%50 \text{ inhibisyon} = (\% \text{ İnhibisyon} / 50) \times 1 / 0.1 = \text{U} / \text{mL} = (\text{AK}-\text{AN})/\text{AK} \times 20 =$
Spesifik aktivite (SA).

Birimi: Doku için: $\text{SA} / (\text{mg protein} / \text{mL}) = (\text{U/mL}) / (\text{mg protein/mL}) = \text{U} / \text{mg protein}.$

3.4.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivite Tayini

GSH-Px (EC 1.11.1.9) tayini, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) GSH-Px tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esasına dayanan ve 340 nm dalga boyunda değişimlerin izlendiği (Paglia ve ark., 1967) yöntemle göre belirlenmiştir. Enzim Ünitesi: Oksidasyona uğrayan NADPH'nin birim zamandaki mikromol cinsinden miktarıdır.

Reaktiflerin Hazırlanması

GSH-Px Tamponu Hazırlama: Önceden hazırlanmış olan pH:7.00 olan fosfat tamponuna EDTA ilavesi ile hazırlanan tampondur.

500 ml Fosfat Taponu +1,04 gr EDTA ilave edilmiştir.

Kokteyl hazırlama ve kokteyl için gerekli çözeltiler;

- 1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum sülfat) çözeltisi: 1,056 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2500 μL su (bu çözelti GSH-redüktaz çözeltisi yapmak için kullanılmıştır).
- 2) GSH-Px Tamponu: 132,5 ml (önceden hazırlanan GSH-Px tamponu)
- 3) GSH: 0,25 gr GSH + 5 ml GSH-Px Tamponu
- 4) NADPH: 0,0333 gr NADPH + 5 ml distile su
- 5) NaN_3 : 0,0325 gr NaN_3 + 500 μL GSH-Px Tamponu
- 6) GSH-redüktaz: 25 μL GSH-redüktaz + 750 μL amonyum sülfat (bu miktar 75 numune içindir, 50 numune için hazırlanan çözeltinin içerisinde 500 μL alınmıştır).

Kokteyl için hazırlanan 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı çözeltiler reaktif şişesine sırasıyla aktarılarak karıştırılmıştır.

H_2O_2 Çözeltisi Hazırlama: %30'luk H_2O_2 ve daha önceden hazırlanan GSH-Px kokteyli karıştırılarak hazırlandı. 15 μL H_2O_2 + 5 ml GSH-Px tamponu.

Pipetleme

Pipetleme için önceden hazırlanmış ve üzerinde grup isim-numarası bulunan tüplerin herbirine GSH-Px aktivite tayini için hazırlanan kokteyl 2870 μL pipetlendi, üzerine 20 μL numune ilavesi yapılarak 30dk 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı (Çizelge 3.7.). Inkübasyonun ardından 100 μL H_2O_2 çözeltisi pipetlenerek tüp hızlıca alt üst edildi ve önceden kinetik ölçüm için hazırlanan spektrofotometrede ölçüm başlatıldı.

Çizelge 3.7. GSH-Px aktivite tayini için pipetleme miktarları.

Kokteyl	2870 ul
Numune	20 ul
30 dk 25 ° C benmaride inkübasyon uygulanır.	
H ₂ O ₂ Çözeltisi	100 ul

Kinetik Okuma

Spektrofotometre cihazı 340 nm dalga boyunda kinetik ölçüm için ayarlandı, havaya karşı sıfırlandıktan sonra 2 dk boyunca numunelere kinetik okuma yapıldı. Ölçüm boyunca gözlemlenen absorbans azalışı kaydedildi.

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması

Kaydedilen absorbans azalışından ve NADPH' in ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak GSH-Px enzim aktivitesi hesaplandı, sonuçlar proteine oranlandı.

$$\text{Hesap: IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

ΔA = OD değişimi, t = zaman (dk), W = Enzim çözeltisinin protein miktarı (mg/mL)

$$\text{NADPH ekstinksiyon katsayısı} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$$

3.4.6. Total Antioksidan Status (TAS) ve Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümleri

Total antioksidan kapasite (TAS) Erel tarafından geliştirilmiş Rel Assay marka kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. E vitaminin suda çözünür bir analogu olan Trolox kalibratör olarak kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox equiv./lt şeklinde ifade edilmiştir (Erel, 2004).

Total oksidan (TOS) kapasite Erel tarafından geliştirilmiş Rel Assay marka kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Hidrojen peroksit kalibratör olarak kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./lt}$ şeklinde ifade edilmiştir (Erel, 2005).

Total oksidan kapasitenin total antioksidan kapasiteye oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen Okidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken, TAS sonucu gösterimindeki mmol değeri TOS sonucu gösterimindeki μmol birimine dönüştürüldü. Sonuçar “arbitrary unit” (AU) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Erel, 2005).

$$OSİ = \frac{TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./lt}}{TAS, \text{mmol Trolox equiv./lt} \times 10} \quad (3.2)$$

Hesaplama yapılmadan önce Total antioksidan kapasitenin birimi mmol Trolox Ekivalent/L den μmol Trolox Ekivalent/L'ye dönüştürülmüştür.

3.5. Histolijik Analizler

Karaciğer ve böbrek doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk Tamponlu formaldehit fiksatifinde tespit edildi. Ardından tespit edilmiş örnekler akar su altında 2 saat süresince yıkandı. Dehidrasyon işlemi için dokular, artan derecelerde alkol serilerine (%60,%70, %80, %90, %96 %100) birer saatlik sürelerle tabi tutulan dokular, şeffaflandırılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından yumuşak parafine gömüldüler. Mikrotom yardımıyla parafin bloklardan 3 μm kalınlığındaki kesitler alındı. Tüm gruplar için Hematoksilen-Eozin Boyama, İmmunhistokimyasal Boyama (Kaspaz3) yöntemi uygulandı. Kesitler Olympus BX-51 araştırma mikroskopunda değerlendirildi ve resimleri çekildi. Hematoksilen-Eozin boyama yapılan dokular histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

3.5.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilol ile deparafinize edildiler. Deparafinizasyon işleminin ardından boyama işlemine hazırlık amacıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100 - %70) çeşme suyunda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen’de iki dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkandılar. Ardından %1 lik amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Daha sonra lamalar 2 dakika Eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Dokuda tüm alan büyüklüğünün sayısal değerlendirilmesinin yapılabilmesi adına, 4x’lik objektif kullanılarak preparat taraması yapılarak istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu.

3.5.2. İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi (Kaspaz 3)

Her deney grubundan hayvana ait karaciğer ve böbrek dokusu bloklarından mikrotom yardımıyla 3 µm’luk kesitler alındı. Kesitler etüvde 1 saat, ardından 30 dakika ksilole alınarak deparafizasyonları sağlandı. Parafini uzaklaştırılan lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirildiler (%100 - %70). Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1’er dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için 1/10 dilue sitrat tampon (AP-9003-999 Thermo Scientific) mikrodalga ile uygulandı. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 10 dakika %3’lük hidrojen peroksit (TA-125-HP Thermo Scientific) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Fosfat tampon ile yıkanan kesitler 10 dakika Protein Blokesi (TA-125-PBQ Thermo Scientific) sağlandı. Nemli ortamda 60 dakika boyunca Primary Antibody ile inkübe edildi. (Anti-Caspase-3 antibody, Abcam (ab4051), Dilue: 1/100).

Amplifier Quanto (TL-125-QPB Thermo Scientific) 20 dakika bekletildi. HRP Polymer Quanto (TL-125-QPH Thermo Scientific) 30 dakika bekletildi. Her aşamada PBS ile dikkatlice yıkama yapıldı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB Chromogen (TA-125-HD Thermo Scientific) ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dakika

süreyle hematoksin uygulanı. Lamlar artan derecelerde alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından ksilen bazlı kapama maddesi damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Elde edilen prepartlar kamera atamanlı ışık mikroskopunda (Olympus CX41) değerlendirilerek resimleri çekildi.

Histomorfometrik İncelemeler

Kaspaz-3 immün boyama, karaciğer ve böbrek hücrelerinin sitoplazmasını boyamaktadır. Değerlendirme, konvansiyonel mikroskop ile (Olympus CX41) x10 ve x20 objektifler kullanılarak yapılmıştır. Sitoplazması immün reaksiyon gösteren (kahverengi boyanan) hücreler kaspaz-3 aktivitesi yönünden pozitif (+), boyanmayan hücreler ise negatif (-) sayılmışlardır. Preparatlar, pozitiflik boyanmanın yoğunluğuna göre hafif +, orta ++ ve belirgin +++ olarak gruplanmıştır. Değerlendirmeye alınan gruplar (kriterlerin sayısı) husus bakımından verilen skorlar toplandı ve diğer gruplarla istatistiksel farkın olup olmadığı araştırılmıştır.

3.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel hesaplamalarda ANOVA multiple comparison, Student Newman-Keuls (SNK) testi kullanılarak tüm grupların, kontrol grubuna göre değişimleri kıyaslandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak belirlendi ve $p < 0.05$ istatistiksel farklılığı gösterdi. Tüm hesaplamalar Prosatat Versiyon 5.04 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1.Bulgular

Alkole karşı biyolojik hassasiyetlerinin daha fazla olması, çalışmamızda dişi rat kullanmamızı tetiklemiştir. Yapılan çalışmalar, uzun süre alkollü diyet ile beslenen sıçan ve farelerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kilo kaybının daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Bertola, 2018; Fromenty ve ark., 2009). Çalışmamızda 30. gün sonunda kontrol grubunda kilo artışı gözlenirken diğer gruplarda kilo azalması gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Deney gruplarının ağırlık ortalamaları.

Gruplar	1. Gün	30. Gün
KONTROL	308 gr	324 gr
ETANOL	322 gr	310 gr
ÖJENOL	315 gr	314 gr
ETANOL ve ÖJENOL	346 gr	328 gr

Alkol tüketimi kan hücreleri üzerinde farklı olumsuz etkilere neden olmaktadır. Alkol tüketen bireyler, yapısal olarak anormal RBC'ler ile karakterize edilen orta derecede anemiden, hafifçe azalmış WBC'lerin, özellikle de nötrofillerden ve orta derecede azalmış trombosit sayısından muzdarip olabilmektedir (Elanchezhian ve ark., 2017). Tam kan sayımı sonucunda gruplar arasında RBC, HGB, HCT MCV, NEU, LYM, MON, EOS parametreleri açısından anlamlı fark bulunurken, WBC, PLT, BAS, MCH ve MCHC parametreleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Karaciğer hücrelerinde her hangi bir nedenden dolayı bir hasar söz konusu olduğunda seruma geçen enzim miktarlarında bir artış oluşmaktadır. Bu enzimler karaciğerin farklı kısımlarında bulunduğundan, bunların kandaki miktarlarının ölçülmesi, karaciğer harabiyetinin belirlenmesinde faydalı olmaktadır. Biyokimyasal analiz sonrasında gruplara ait serum biyokimyasal analiz düzeyleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının tam kan sayımı parametreleri ($p < 0,05$).

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL + ÖJENOL
WBC ($10^3/uL$)	6,02 $\pm$ 1,08	5,82 $\pm$ 0,86	6,80 $\pm$ 0,81	5,60 $\pm$ 0,67
RBC ($10^6/uL$)	6,74 $\pm$ 0,41	7,74 $\pm$ 0,25*	6,95 $\pm$ 0,14	6,86 $\pm$ 0,27**
HGB (g/dL)	12,98 $\pm$ 0,67	13,90 $\pm$ 0,25*	12,94 $\pm$ 0,11	12,96 $\pm$ 0,38**
HCT (%)	42,88 $\pm$ 2,78	45,44 $\pm$ 0,98*	42,68 $\pm$ 0,84	42,04 $\pm$ 1,30**
MCV (fL)	62,32 $\pm$ 1,20	61,08 $\pm$ 2,08	62,14 $\pm$ 2,30	59,34 $\pm$ 0,81**
PLT ($10^3/uL$)	656,80 $\pm$ 40,49	715,20 $\pm$ 85,26*	667,40 $\pm$ 53,93	651,40 $\pm$ 53,39
LYM ($10^3/uL$)	70,62 $\pm$ 1,95	62,78 $\pm$ 5,17	68,40 $\pm$ 5,39	52,64 $\pm$ 7,43**
MON ($10^3/uL$)	8,12 $\pm$ 0,46	11,76 $\pm$ 0,92*	8,98 $\pm$ 1,34	10,06 $\pm$ 0,60**

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Çizelge 4.3. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının kan serumundaki bazı biyokimyasal parametreler ($p < 0,05$).

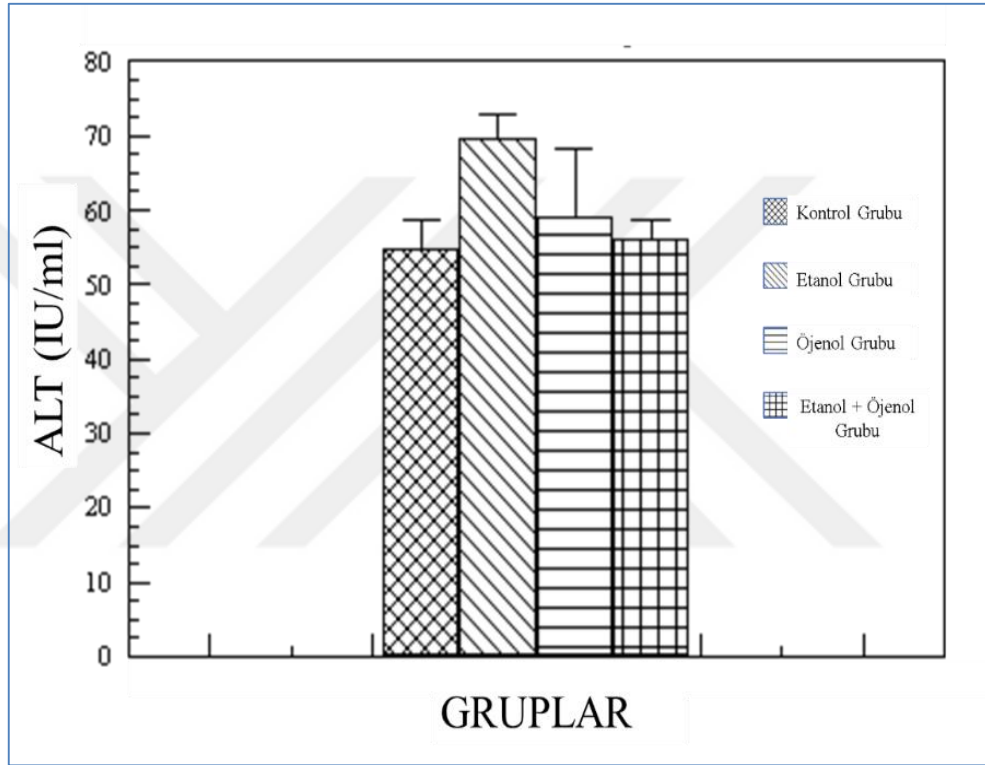
Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL + ÖJENOL
AST (U/L)	128,87 $\pm$ 15,86	165,20 $\pm$ 39,82*	116,60 $\pm$ 11,80	121,00 $\pm$ 20,23**
ALT (U/L)	54,80 $\pm$ 3,96	69,75 $\pm$ 3,20*	59,00 $\pm$ 9,38	56,20 $\pm$ 2,58**
BİLD (mg/dl)	0,034 $\pm$ 0,005	0,038 $\pm$ 0,008	0,030 $\pm$ 0,010	0,034 $\pm$ 0,009
BİLT (mg/dl)	0,016 $\pm$ 0,013	0,032 $\pm$ 0,026	0,026 $\pm$ 0,017	0,018 $\pm$ 0,013
CHOL (mg/dl)	42,60 $\pm$ 3,78	43,40 $\pm$ 4,61	42,00 $\pm$ 3,53	38,00 $\pm$ 4,63
LDH (U/L)	1147,75 $\pm$ 118,23	1169,20 $\pm$ 139,75	979,80 $\pm$ 103,34	647,80 $\pm$ 156,60**
TRİG (mg/dl)	50,80 $\pm$ 5,63	77,20 $\pm$ 14,01*	50,40 $\pm$ 8,08	54,20 $\pm$ 11,56**
ALP (U/L)	102,80 $\pm$ 12,96	75,40 $\pm$ 4,98*	123,20 $\pm$ 21,44	77,20 $\pm$ 9,73

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Kontrol grubunda AST değerlerinin ortalama ve standart sapma (ort ve $\pm$ SD) değerleri sırası ile 128.87 $\pm$ 15,86 olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Eth grubu 165.20 $\pm$ 39.82 ile en yüksek AST değerine sahip iken, Öj grubu 116.60 $\pm$ 11.80 ile en düşük AST değerlerine sahiptir ($p < 0,05$).

Kontrol grubuna göre Eth, Öj ve EthÖj gruplarında ALT düzeyinde anlamlı bir artış saptandı ($p < 0.05$). En yüksek ALT düzeyi $69,75 \pm 3,20$ ile Eth grubuna ait iken en düşük ALT düzeyi $54,80 \pm 3,96$ ile Kontrol grubunda saptandı. ALT düzeyi Öj grubunda Eth grubuna göre azalırken kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptandı (Şekil 6.). Yaptığımız çalışmada, Çizelge 4.4.'te gösterildiği gibi Eth grubunda AST/ALT oranında (2.368) diğer gruplara göre bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.1. Gruplar arasında ALT dağılımı

Çizelge 4.4. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının AST/ALT değerleri.

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL + ÖJENOL
AST (U/L)	128.876	165.200	116.600	121.000
ALT (U/L)	54.800	69.750	59.000	56.200
AST/ALT	2.352	2.368	1.976	2.153

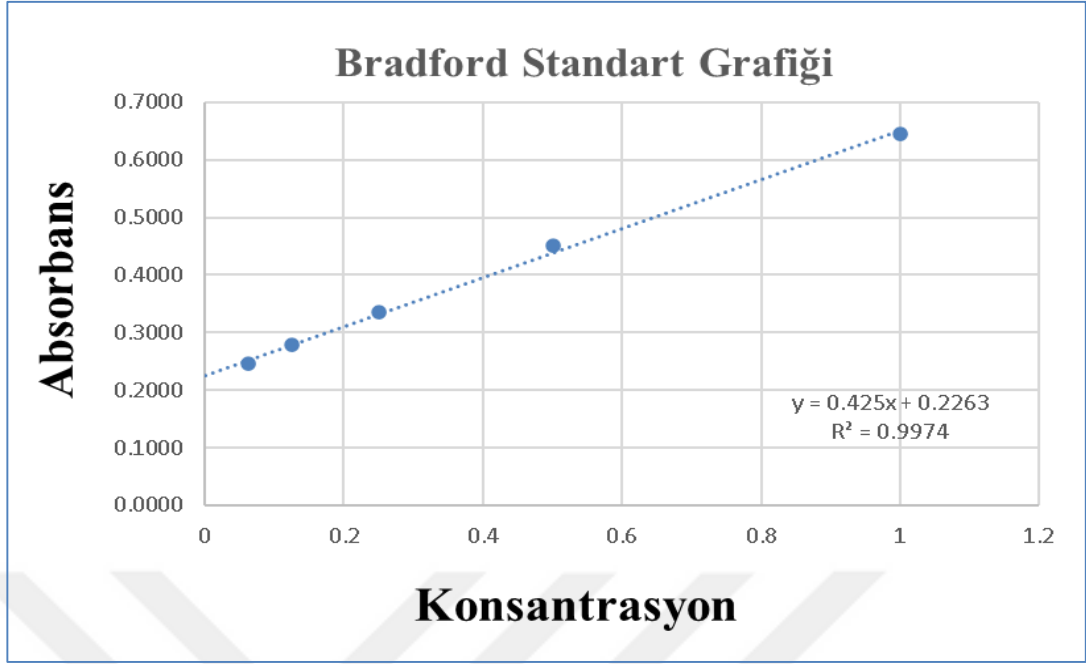
BİLD için gruplar arasındaki değişim anlamlı olarak saptandı. Kontrol grubuna göre BİLD ($0,034 \pm 0,005$) düzeyi Öj grubunda ($0,030 \pm 0,010$) azalırken Eth grubunda ($0,038 \pm 0,008$) artış ve EthÖj ($0,034 \pm 0,009$) grubunda da çok fazla bir değişim göstermedi. BİLT düzeyi kontrol grubu hariç tüm gruplarda artış gösterdi. En yüksek BİLT değeri $0,032 \pm 0,026$ ile Eth grubunda saptandı ($p < 0,05$).

CHOL düzeyinde gruplar arasında anlamlı oranda bir değişim söz konusu olmadı ancak $43,40 \pm 4,61$ değeri ile Eth en yüksek grup olarak saptandı. LDH düzeyinde gruplar arasında anlamlı fark vardı ve $1169,20 \pm 139,75$ değeri ile Eth grubu en yüksek grup olarak saptandı. TRİG grupları arasında da anlamlı oranda bir değişim saptandı. TRİG düzeyi karşılaştırıldığında en yüksek Eth grubu ($77,20 \pm 14,01$) iken en düşük grup Öj grubu ($50,40 \pm 8,08$) olmuştur. ALP düzeyi gruplar arasında en yüksek Öj grubunda ($123,20 \pm 21,44$) iken en düşük Eth grubunda ($75,40 \pm 4,98$) saptandı ($p < 0,05$).

BSA ile hazırlanan stok standart çözeltisinin seyreltilmesi, standart grafiğinin oluşturulması ve bu grafikten yararlanarak oluşturulan gruplar arasındaki homojenat protein konsantrasyonlarının dağılımı aşağıda belirtilen şekilde olmuştur (Çizelge 4.5., Şekil 7.).

Çizelge 4.5. BSA ile hazırlanan stok standart çözeltinin seyreltilme oranları.

Standartlar	Dilüsyon oranı	Konsantrasyon (mg/ml)
St1	1	1.0000
St2	1/1	0.5000
St3	1/2	0.2500
St4	1/4	0.1250
St5	1/8	0.0625



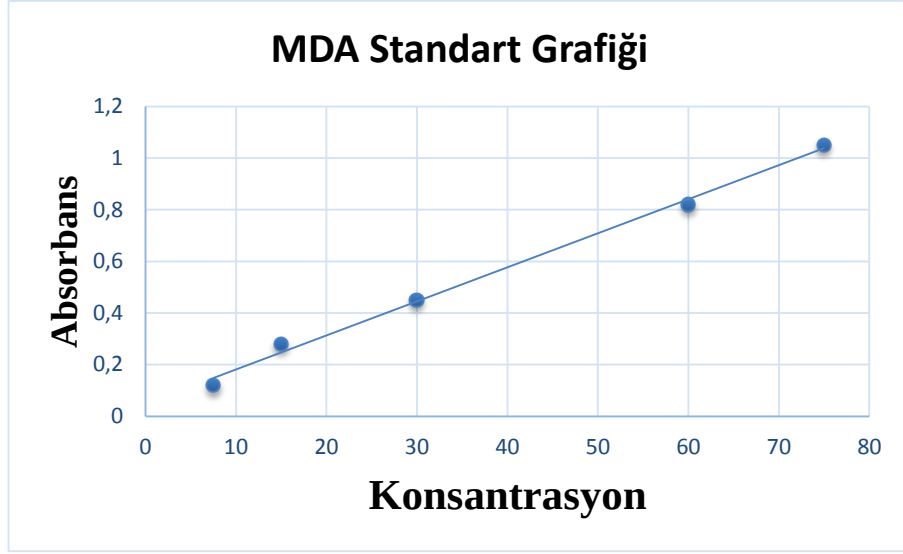
Şekil 4.2. Bradford Standart Grafiği

Çizelge 4.6. Karaciğer dokularında ölçülen protein miktarları ($p < 0,05$).

	Gruplar			
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
Homojenat protein konsantrasyonu (mg protein/gr doku)	15.6451 ±1.7184	13.8585 ±2.2663	15.9574 ±1.5232	14.8405 ± 0.8570

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler



Şekil 4.3. MDA Standart Grafiği

Çizelge 4.7. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku MDA Aktivitelerinin Karşılaştırılması ($p < 0,05$).

	Gruplar			
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
MDA Enzim Aktivitesi (nmol /mg protein)	1.774±0.28	3.430 ± 1.29*	1.921±0.24	2.69 ± 0.74

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler.

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, karaciğerde etanol toksisitesinde lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan MDA'nın önemli şekilde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Tsukamoto ve ark., 1995, Tuma ve ark. 1996). Bizim çalışmamızda da alkol uygulaması sonrası MDA düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış ile önceki çalışmalara paralellik göstermiştir (Çizelge4.7.). En yüksek MDA miktarı Eth grubunda olmasına rağmen, öjenolün tek başına yada etanol ile beraber kullanılmasında MDA miktarında bir düşüş olmuştur.

Çizelge 4.8. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku CAT Aktivitelerinin Karşılaştırılması (p< 0,05).

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
CAT Enzim Aktivitesi (U/ gr Doku)	20.899 ± 7.50	8.699 ± 2.97*	10.406 ± 2.85	10.729 ± 4.25**

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler.

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Çizelge 4.9. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku SOD Aktiviteleri ve Karşılaştırılması (p< 0,05).

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
SOD Enzim Aktivitesi (U/mg protein)	0.0904 ± 0.0711	0.0775 ± 0.0991	0.0863 ± 0.0985	0.1350 ± 0.0815

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler.

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Çizelge 4.10. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol Gruplarının Doku GSH-Px Miktarları (p< 0,05).

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
GSH-PX Enzim Aktivitesi (U/gr doku)	0.3064 ± 0.1238	0.1601 ± 0.0543*	0.1560 ± 0.0604	0.1168 ± 0.0394

* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler.

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

Dokularda serbest radiklerin zararlı etkilerini gidererek hücreleri koruyan savunma sistemleri vardır. Bu sistemlerin başında antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px enzimleri gelir. Birçok çalışmada çeşitli antioksidan ajanların bu enzim sistemleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda etanol uygulanan grupta SOD, CAT ve GSH-PX antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş saptanmıştır. Diğer gruplarda GSH-PX dışındaki antioksidan enzim aktivitelerinde düzelme saptanmıştır. Buna göre öjenolün tekbaşına ya da etanol ile beraber uygulamasının antioksidan enzimler (SOD ve CAT) üzerinde iyileştirici bir etki göstermiştir

Çalışmamızda sistemik oksidatif stresin göstergesi olarak serumda TAS ve TOS ölçümleri yapılmış ve OSİ değerleri de hesaplanmıştır. TAS düzeyi için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda bir fark olduğu saptanmıştır (Çizelge 4-10.). Eth grubunun TAS düzeyi ($1,49 \pm 0,13$) Kont grubuna göre ($1,62 \pm 0,25$) düşük bulunmuştur. Öjenol uygulaması yapılan grup $1,86 \pm 0,19$ ile en yüksek değere sahip iken EthÖj grubu en düşük ($1,33 \pm 0,09$) değere sahiptir. TOS düzeyi için gruplar arasında anlamlı oranda bir fark saptanmamasına rağmen, etanol uygulanan grupta TOS seviyesi $16,58 \pm 4,42$ değeri ile en yüksek düzeyde bulunmuştur. Buna göre Eth grubu OSİ değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup ($P < 0,001$) diğer bulguları destekler niteliktedir (Çizelge 4.10.). EthÖj grubunun OSİ değeri kontrol grubuna benzer olması Öjenolün sistemik oksidatif stres üzerinde iyileştirici etkisi olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.11. Kontrol, Etanol, Öjenol, Etanol ve Öjenol gruplarının kan serumundaki TAS ve TOS parametreleri ($p < 0,05$).

Gruplar				
	KONTROL	ETANOL	ÖJENOL	ETANOL VE ÖJENOL
TAS (mmol/L)	$1,62 \pm 0,25$	$1,49 \pm 0,13$	$1,86 \pm 0,19$	$1,33 \pm 0,09$
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	$12,46 \pm 1,35$	$16,58 \pm 4,42$	$11,86 \pm 1,58$	$13,14 \pm 2,63$
OSİ (AU)	$0,77 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,18^*$	$0,64 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,13$

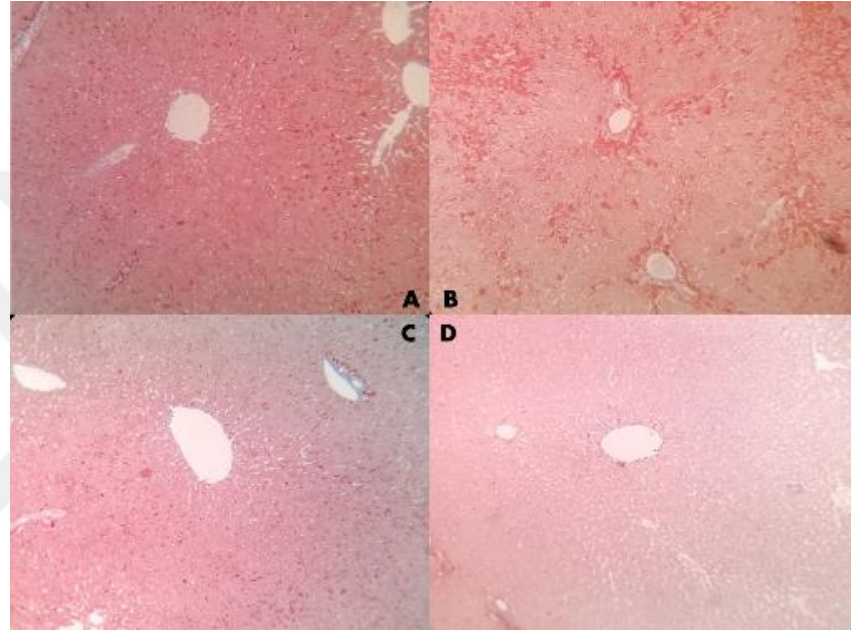
* Kontrol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler.

** Etanol grubuna göre anlamlı değişim gösteren değerler

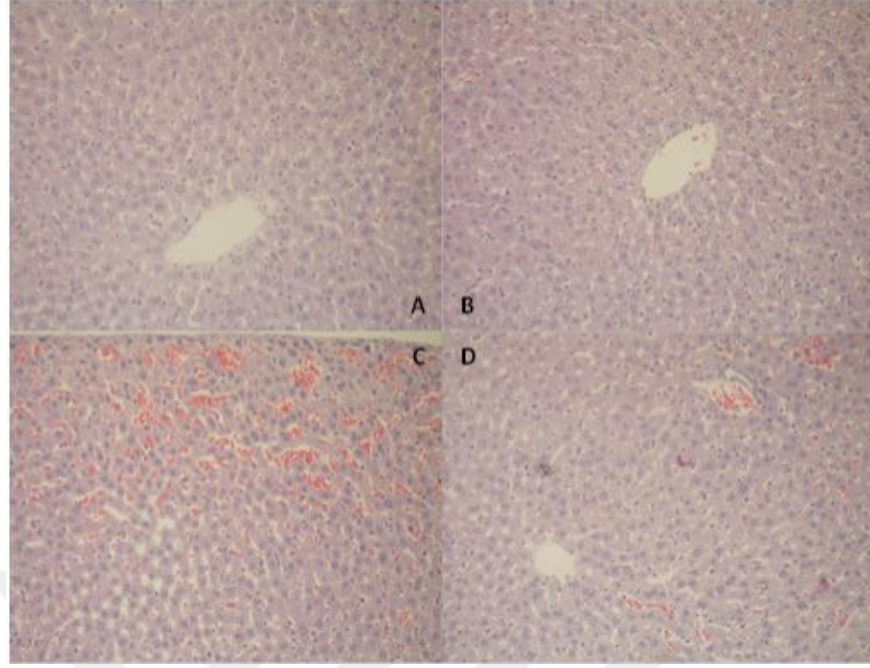
Alkol kullanımına bağlı olarak karaciğer histolojisinde meydana gelen değişiklikler, makro ve mikro veziküler yağ birikimi, hepatosit balonlaşması, hücre infiltrasyonu, Mallory-Denk cisimciği, nötrofilik inflamasyon, periselüler fibrozis, hiyalin sklerozis, fibrozis ve kolestazis gibi yapılar gözlenmektedir (S. Li ve ark., 2015).

Gruplar histopatolojik olarak karşılaştırıldığında Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında dejenerasyon düzeyleri açısından anlamlı farklar vardır (Şekil 9. ve Şekil 10.). Kontrol grubu sıçanlarda karaciğerin normal histolojik yapıda olduğu gözlenmiştir. Eth grubu sıçanların karaciğer hepatositlerinde yoğun diffuz dejenerasyon ve kimi yerlerde nekrotik hücrelere rastlandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Eth grubunda alkole

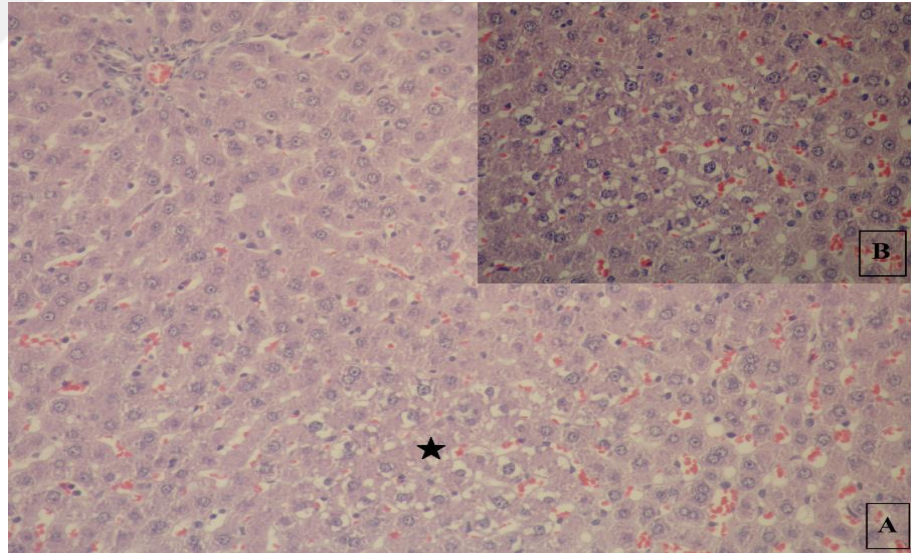
bağlı olarak hücre içi makro ve mikro veziküler yağ birikimi, çoğunluğu lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu, hidropik dejenerasyon, bazı hepatosit hücrelerinde çift çekirdekli yapılar ve sinozoidal boşluklarda yer yer eritrosit varlığı gözlenmiştir. Öjenol ilave edilen grupta dejenerasyonların azaldığı saptanmıştır. Eth grubu sıçanların karaciğer hepatositlerinde şiddetli yaygın dejenerasyon ve mikroveziküler yağ değişiklikleri gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 4.4. Kaspaz-3 aktivitesini gösteren karaciğer dokusu. Kontrol (A), Etanol (B), Öjenol (C), Etanol ve Öjenol (D) gruplarının aktivitesi.



Şekil 4.5. Hematoksilen Eozin ile boyanan karaciğer dokusu. Kontrol (A), Öjenol (B), Etanol (C), Etanol ve Öjenol (D) gruplarının Karaciğer histopatolojisi (H&E, X200).

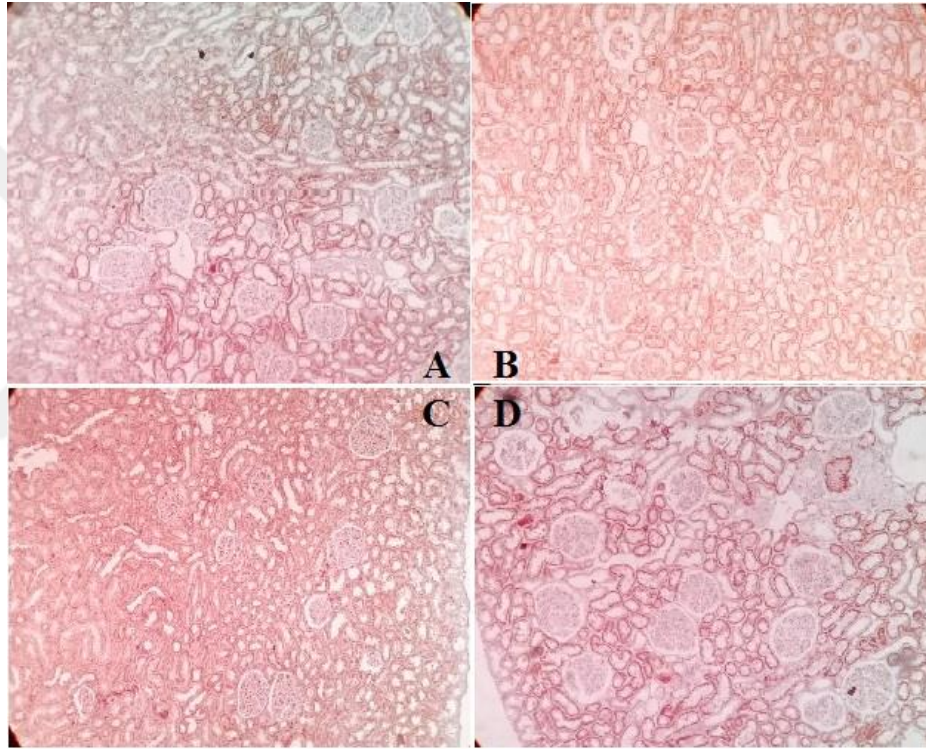


Şekil 4.6. Hematoksilen Eozin ile boyanan karaciğer dokusu. A; Etanol grubu sıçanların karaciğerinde gözlenen mikroveziküler yağ değişimi (yıldız işareti), (H&E, X200), B; Büyütülmüş bölge, yıldız işareti (H&E, X400)

Çizelge 4.12. Karaciğer ve Böbrek dokusundaki yarı istatistiki kaspaz-3 aktivite skoru

Gruplar	Karaciğer	Böbrek
Kontrol	- / +++	+++
Etil Alkol	++/ +++	+++
Etil Alkol + Eugenol	+++	+++
Eugenol	++/ +++	+++

• Sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitiflik boyanmanın yoğunluğuna göre hafif +, orta ++ ve belirgin +++ olarak gruplanmıştır.



Şekil 4.7. Böbrek dokusunda görülen Kaspaz-3 aktivitesi (A: Kontrol grubu 20X, B: Etanol Grubu 20X, C: Öj+Etanol grubu 20X, D: Öjenol 20X).

Kaspazlar, hücrede normalde aktif olmayan proenzimler olarak yer almaktadırlar. Ancak proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve kaspaz aktivasyonu başlamış olurlar. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. Kaspaz-3 aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan immunohistokimya boyama ile elde edilen yarı istatistiksel verilere göre; karaciğer ve böbrek dokusunda, hemen hemen bütün gruplarda ve hayvanlarda sitoplazmik olarak boyanma meydana gelmiştir (Şekil 12). Yalnızca

karaciğer dokusuna kontrol grubuna ait bazı preparatlarda boyanma görülmemiştir (kaspaz-3 negatif (-)). Etil alkol ve Eugenol grubuna ait bazı preparatlarda orta (++) ve belirgin (+++) derecede boyanma görülmüştür. Böbrek dokusuna ait tüm grup ve hayvanlarda ise kaspaz-3 pozitif boyanma belirgin (+++) düzeyde gözlenmiştir.

4.2.Tartışma

Çalışmamızda deney gruplarının 30. gün ağırlık ortalamalarında sadece Kontrol grubunda kilo artışı gözlemlenirken, Öj grubunda kilo sabit kalmış ve Eth ve EthÖj grubunda kilo kaybı gözlenmiştir. Alkol alan grupta kilo kaybı muhtemelen iştah azalması ve daha sonra oluşan karaciğer hasarına bağlı olarak gıda alımının azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Sıçanlarda yüksek seviyede etanol alımı, akyuvar ve alyuvar sayılarında, hemoglobin konsantrasyonlarında, eritrosit çaplarında, eritrosit sodyum ve potasyum seviyelerinde düşüşler meydana getirebilmektedir. Bizim çalışmamızda, Çizelge 4.2.'de gösterildiği gibi Eth grubunda RBC ($7,74 \pm 0,25$), HGB($13,90 \pm 0,25$), HCT ($45,44 \pm 0,98$) ve PLT ($715,20 \pm 85,26$) değerleri Kontrol grubuna göre artış gösterirken, WBC ($5,82 \pm 0,86$), LYM ($62,78 \pm 5,17$) ve MCV ($61,08 \pm 2,08$) değerlerinde düşüş olmuştur. Öj grubu ile Kontrol grubu kan değerleri birbirine yakın çıkmıştır. NEU, LYM, MON ve BAS verilerimiz diğer çalışmalar ile paralellik göstermiştir (Kawashima ve ark., 2011; Sonila ve ark., 2015).

Karaciğer fonksiyon testlerinin (AST, ALT, LDH, ALP vs.) normalden daha yüksek seviyelerde olması karaciğer problemlerini göstermektedir. Çalışmamızda Kontrol grubu ile deneme grupları arasında serum AST ($165,20 \pm 39,82$), ALT ($69,75 \pm 3,20$), ALP ($75,40 \pm 4,98$), LDH ($1169,20 \pm 139,75$) ve TRİG ($77,20 \pm 14,01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken BİLD ($0,038 \pm 0,008$), BİLT ($0,032 \pm 0,026$) ve CHOL ($43,40 \pm 4,61$) seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (<0.05). Eth grubundaki biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde, ALP haricindeki tüm parametrelerde bir artış olmuştur. Bu da etanolün karaciğer harabiyetini göstermektedir. Öj grubundaki ALT, BİLT ve ALP seviyeleri Kontrol grubuna göre daha yüksek ve AST, BİLD, CHOL, LDH ve TRİG seviyeleri daha düşük çıkmıştır. EthÖj grubundaki tüm biyokimyasal parametrelere bakıldığında Eth grubunun tam tersine

oldukça düşük seviyede değerler gözlemlenmiştir. EthÖj grubunda AST, CHOL, LDH ve ALP sevipleri Kontrol grubunda altında bir değer vermiştir. Bunun da öjenolün karaciğeri koruyucu etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında AST/ALT oranının azaldığı gözlenirken alkolik karaciğer hasarında AST/ALT oranı artmaktadır. Yaptığımız çalışmada, Eth grubunda AST/ALT oranında diğer gruplara göre bir atış saptanmıştır. Öjenolün tek başına yada etanol ile beraber tüketilmesi sonucunda hem Eth grubuna göre hem de Kontrol grubuna göre daha düşük bir AST/ALT oranı bulunmuştur.

Çalışmamızda alkol uygulaması sonrası MDA düzeylerinde, istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış ve SOD, CAT ve GSH-PX antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş ile önceki çalışmalara paralellik göstermiştir. En yüksek MDA miktarı Eth grubunda olmasına rağmen, öjenolün tek başına ya da etanol ile beraber kullanılmasında MDA miktarında bir düşüş ve SOD ve CAT enzim aktivitelerinde bir artış olmuştur. Bu değişimler de öjenolün antioksidan özelliğinden ve antioksidan enzimler (SOD ve CAT) üzerinde iyileştirici etkisinden kaynaklanmaktadır.

Gruplar histopatolojik olarak incelendiğinde Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında dejenerasyon düzeyleri açısından anlamlı farklar bulunmuştur. Eth grubu sıçanların karaciğer hepatositlerinde şiddetli yaygın dejenerasyon ve mikroveziküler yağ değişiklikleri gözlenmiştir. Eth grubu ile kıyaslandığında, Öj grubunda dejenerasyonların az olması, Öjenolün karaciğeri koruyucu etkisinden kaynaklanmaktadır. Kaspaz-3 aktivitesinde hemen hemen bütün gruplarda ve hayvanlarda sitoplazmik olarak boyanma meydana gelmiştir. Yalnızca karaciğer dokusuna Kontrol grubuna ait bazı preparatlarda boyanma görülmemiştir. Etil alkol ve Eugenol grubuna ait bazı preparatlarda orta ve belirgin derecede boyanma görülmüştür. Böbrek dokusuna ait tüm grup ve hayvanlarda ise kaspaz-3 pozitif boyanma belirgin düzeyde gözlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Alkolün metabolize olduğu en önemli organ karaciğer (%90-95) olduğu için zararlı etkilere en fazla maruz kalan organ da karaciğerdir. Alkol bu zararlı etkilerini en çok oksidan ve antioksidan dengesi bozarak oluşturmaktadır. Alkolün ekstrahepatik metabolizması çok azdır. Alkol, sitozolde alkoldehidrojenaz, mikrozomlarda ise sitokrom P450 ve peroksizomlarda katalaz ile asetaldehite metabolize edilir (Gao ve ark., 2011). İleri oksidasyona uğradığında serbest radikal üretimini arttırarak oksidan-antioksidan sistemin dengesini bozmaktadır. Alkolün zararlı etkilerini yok etmek veya en aza indirmek için, vücutta sentezlenen ya da günlük alınan ve antioksidan özelliğe sahip birçok madde üzerinde araştırma yapılmıştır. Literatür verilerine göre modern tıbbın ilerlemesine ve hepatik hücrelerin rejenerasyonuna yardımcı ve karaciğeri koruyan ilaçlar bulunmasına rağmen karaciğer hastalıklarını önlemede geleneksel öneme sahip çeşitli bitki özütlerinin kullanıldığı rapor edilmiştir (Chattopadhyay, 2003).

Öjenol antioksidan özelliği nedeniyle gıda endüstrisinde ve kozmetik endüstrisinde koruyucu olarak ve aroma katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Barboza ve ark., 2018). Biz de çalışmamızda öjenol maddesinin yüksek antioksidana sahip olmasından ve suda kısmen çözünmesinden yola çıkarak, antioksidan özelliği de bulunan zeytinyağı v.b. diğer bazı çözücüler içerisinde çözmeden, direkt olarak uygulandığında karaciğer üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu saptamayı amaçladık. Guenette ve ark., sıçanlarda, öjenolün plazma içindeki yarılanma ömrünün ($t_{1/2}$) yaklaşık 14 saat ve kanda 18 saat olduğunu bildirmişlerdir (Guénette ve ark., 2007).

Anbu ve arkadaşları öjenolü zeytinyağında çözdürülerek kullanmışlar ve ethanol haricinde diğer tüm gruplarda kilo artışı gözlemlemişlerdir (Anbu ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise sadece kontrol grubunda kilo artışı, Öj grubunda kilo sabit kalmış ve Eth ve EthÖj grubunda kilo kaybı gözlenmiştir. Bu farklılığın sebebinin Öjenolün tek başına kullanılmasından kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Alkol kullanımına bağlı olarak, yapısal yönden anormal RBC'ler ile karakterize edilen orta derecede anemi, WBC'lerin, özellikle de nötrofillerin hafifçe azlığı ve orta

derecede azalmış trombosit sayısı gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Ballard, 1997; Xiao, 1998).

Yalçın ve ekibi yapmış oldukları çalışmada sıçanlarda yüksek seviyede (%15 v/v) etanol alımının akyuvar ve alyuvar sayılarında, hemoglobin konsantrasyonlarında, eritrosit çaplarında, eritrosit sodyum ve potasyum seviyelerinde, kontrol grubuna göre düşüşler olduğunu bildirmişlerdir (Yalçın ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda Eth grubunda WBC, MCV ve LYM değerlerinde kontrol grubuna göre azalma gözlenirken RBC, HGB, HCT, PLT, MCH, NEU, MON ve diğer parametrelerde artış gözlemlenmiştir.

Gülçin ve arkadaşları, karanfil yağının antioksidan aktivitesini sentetik antioksidanlar ile karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Karanfil yağı, BHA, BHT, a-tokoferol ve troloksun antioksidan aktivitesini linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat yöntemiyle belirlemişlerdir. Sonuçta karanfil yağı, % 99.7 oranında, aynı koşullar altında, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), a-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin sırasıyla %95.5, 99.7, 84.6 ve 95.6 oranında inhibisyon gösterdiğini bulmuşlardır (Gülçin ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada 30 kadar bitkinin özütleri, DPPH ve ABTS radikal süpürücü kapasite testi, oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) testi, SOD analizi ve ferrik indirgeyici antioksidan potansiyeli (FRAP) analizi kullanılarak antioksidan özellikleri açısından araştırılmış sonuçta karanfilin güçlü antioksidan özellik ve yüksek fenolik içeriğe sahip olduğunu (200 mg GAE/g) göstermişlerdir (Dudonne ve ark., 2009).

Yogalakshmi ve ekibi 15 gün boyunca sıçanlarda öjenol (10.7 mg / kg.bw /gün) ile ön muamelenin, lipid peroksidasyon indekslerinde, protein oksidasyonunda ve enflamatuvar markörlerde ve glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi antioksidanları koruyarak antioksidan durumunu iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır (Yogalakshmi ve ark., 2010). Prakash ve ekibi, öjenol (5 mg / kg bwt) ile arsenik trioksit (As_2O_3) birlikte muamele edildiğinde, AST ve ALT düzeylerinin, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit seviyesinin kontrol grubuna göre normalize edildiğini, azalan arsenik birikimi ile hepatoprotektif etkiler gösterdiğini saptamışlardır (Prakash ve ark., 2018). Thuwaini ve ekibi, karanfil özütlerinin, parasetamol ile oluşturulan karaciğer hasarına etkilerini incelemiş ve kan

serumundaki total albümin miktarında azalma ve bilirubin, ALT, AST ve ALP düzeyinde artış olduğunu belirtmişlerdir (Thuwaini ve ark., 2018). Muller ve ekibi, etanol ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı Pikan cevizi kabuğu özütünün karaciğeri koruyucu aktivitesini araştırmış ve çalışma sonunda etanol ile kronik olarak muamele edilmiş sıçanlarda artan plazmatik transaminaz (ALT, AST) seviyelerini bulmuşlardır. Sonuçta Pikan cevizi kabuklarının etanol tüketimi ile ilgili karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için ekonomik bir ajan olabileceği belirtilmiştir (Müller ve ark., 2013). Bu çalışmalardaki bulgular, yaptığımız çalışmayı desteklemekte olup, benzer şekilde çalışmamızda da Eth grubu ratlarda AST ve ALT düzeylerinde anlamlı bir şekilde artış saptadık ($<0,05$). Diğer gruplar arasında ALT dağılımı Şekil 7’de gösterilmiştir. AST ve ALT karaciğer hasarını, GGT ve ALP karaciğer ile birlikte safra yollarındaki hasarı, Albümin, pıhtılaşma testleri ve INR karaciğerin fonksiyon bozukluğunu göstermektedir (Goorden ve ark., 2013). Alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında AST/ALT oranının azaldığı gözlenirken alkolik karaciğer hasarında AST/ALT oranı artmaktadır (Nyblom ve ark., 2004). Yaptığımız çalışmada, Eth grubunda AST/ALT oranı Öj ve EthÖj grubuna göre bir artış gözlenirken Kontrol grubuna göre bir artış saptanmamıştır. Bu artışın sebebinin AST miktarındaki yüksek artıştan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

LDH karaciğer dokusu dâhil birçok dokuda bulunan ve bu dokuların zarar görmesi halinde seruma geçen bir enzimdir. Abd El Motteleb ve ark., çalışmalarında düşük öjenol dozunun (10 mg öjenol/kg/gün), lipid peroksidasyon seviyelerini azaltarak karaciğeri iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyabileceğini göstermişlerdir. 10mg öjenol grubu ile tedavi edilen sıçanlarda AST, ALT ve LDH düzeylerinde I/R grubuna göre önemli azalma olduğunu saptamışlardır (Abd El Motteleb ve ark., 2014). Çalışmamızda ise LDH düzeyinde, Eth grubuna göre ($1169,20 \pm 139,75$) Öj grubunda ($979,80 \pm 103,34$) ve EthÖj grubunda ($647,80 \pm 156,60$) anlamlı derecede bir azalma saptanmıştır. Bu da öjenolün karaciğeri koyurucu antioksidan özelliğinden kaynaklandığı fikrini desteklemektedir.

Eth grubunun TAS düzeyi ($1,49 \pm 0,13$) Kont grubuna göre ($1,62 \pm 0,25$) düşük bulunmuştur. Buda bize etanolün antioksidanlar üzerindeki toksik etkisini göstermektedir (Basarslan ve ark., 2017). En yüksek TAS düzeyi Öj grubunda ($1,86 \pm 0,19$) bulunmuştur. Total oksidan düzeyinde ise Eth grubu ($16,58 \pm 4,42$) en yüksek grup iken EthÖj

grubunda ($13,14 \pm 2,63$) bu değer kontrol grubuna yakın bir değerdedir. Bu durumun, öjenolün antioksidan özelliğinden ötürü meydana geldiğı söylenebilir.

Oksidatif stresin yönünü belirlemekte kullanılan OSİ indeksi verileri göz önüne alındığında, karaciğer harabiyetinde öjenol verilen gruplarda oksidatif stres yönünün antioksidanlar yönüne kaydığını gözlemledik. OSİ sonuçlarını değerlendirdiğimizde öjenolün antioksidan özelliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Histolojik incelemede, Eth grubunda alkole bağlı olarak hücre içi makro ve mikro veziküler yağ birikimi, çoğunluğu lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu, hidropik dejenerasyon, bazı hepatosit hücrelerinde çift çekirdekli yapılar ve sinozoidal boşluklarda yer yer eritrosit varlığı gözlenmiştir. Öjenol ilave edilen grupta bu dejenerasyonların azaldığı saptanmıştır. Öjenolün karaciğer üzerindeki olumlu etkileri hem biyokimyasal sonuçlarımız hem de histopatolojik veriler ile desteklemiştir.

Sonuç olarak ratların karaciğerinde etanol ile oluşturulan toksikasyonda öjenolün yalnız başına antioksidan madde olarak kullanılması biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgular üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ve karaciğer hasarlanmasını anlamlı ölçüde engellediğı bulunmuştur. Tam kan sayımı üzerindeki farklı etkilerinin belirlenmesi konusunda yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda kaspas-3 aktivitesinin belirlemek amacıyla immunohistokimya boyama tekniklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen yarı istatistiksel veriler, kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda bazı hayvanlarda herhangi bir kaspaz-3 aktivitesi görülmemişken aynı gruptan bir kısım hayvanda ise kaspaz-3 aktivitesine rastlanılmıştır. Alkol verilen tüm hayvanların hem karaciğer hemde böbrek dokusunda belirgin ölçüde bir kaspaz-3 aktivitesi görüldü. Bu durum alkolün, hücrelerde meydana getirdiğı hasarın sonucu olarak, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik gerçekleşmiş olduğu fikrini desteklemektedir. Öte yandan hem karaciğer hem de böbrek dokularında benzer şekilde belirgin kaspaz-3 aktivitesine rastlanılmış olup, eugenol ilavesinin kaspaz-3 düzeyi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Elde ettiğimiz tüm biyokimyasal ve histolojik verilerin bir sonucu olarak, ratların karaciğerinde etanol ile oluşturulan toksikasyonda öjenolün yalnız başına antioksidan madde olarak kullanılması biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgular üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ve karaciğer hasarlanmasını anlamlı ölçüde azalttığını

söyleyebiliriz. Gerek biyokimyasal olarak tam kan sayımı üzerindeki farklı etkilerinin gerekse histolojik değişimlerin belirlenmesi konusunda yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abd El Motteleb, D. M., Selim, S. A., ve Mohamed, A. M., 2014. Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. **Journal of immunotoxicology**, 11(3), 238–245.
- Abdel-Wahhab, MA., Aly, SE., 2005 Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. **J Appl Toxicol**. May-Jun;25(3):218-23. doi: 10.1002/jat.1057. PMID: 15856529.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology: Academic Press* (Vol. 105, pp. 121-126).
- Agnez-Lima, L. F., Melo, J. T. A., Silva, A. E., Oliveira, A. H. S., Timoteo, A. R. S., Lima-Bessa, K. M., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Galhardo, R. S., ve Menck, C. F. M. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 751(1), 15-28. doi:https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.005
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri.: **Mimoza Yayınları**.
- Aktaş, E., 2014. Ratlarda Parasetamol İle Oluşturulan Hepatotoksisite Üzerine Taraxacum officinale Etanol Ekstraktının Etkisi. **Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi)**.
- Aladağ, M. A., Türkoz, Y., ve Özerol, İ. H., 2000. Nitric oxide and Its Neurophysiopathological Effects **Türkiye Klinikleri J Med Sci**, 20(2), 107-111.
- Albano, E., 2006. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Proceedings of the Nutrition Society**, 65(03), 278-290.
- Aldred, E. M., Buck, C., ve Vall, K., 2009. Chapter 7 - Free radicals. In E. M. Aldred, C. Buck, ve K. Vall (Eds.), *Pharmacology Edinburgh: Churchill Livingstone* (pp. 41-52).
- Ali, N., Yusof, H., Long, K., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B., Koh, S. P., Abdullah, M., ve Alitheen, N., 2013. Antioxidant and Hepatoprotective Effect of Aqueous Extract of Germinated and Fermented Mung Bean on Ethanol-Mediated Liver Damage. **BioMed research international**, 2013, 693613. doi:10.1155/2013/693613
- Allam, R. M., Selim Da Fau - Ghoneim, A. I., Ghoneim Ai Fau - Radwan, M. M., Radwan Mm Fau - Nofal, S. M., Nofal Sm Fau - Khalifa, A. E., Khalifa Ae Fau - Sharaf, O. A., Sharaf Oa Fau - Toaima, S. M., Toaima Sm Fau - Asaad, A. M., Asaad Am Fau - El-Sebakhy, N. A., ve El-Sebakhy, N. A., 2013. Hepatoprotective effects of Astragalus kahiricus root extract against ethanol-induced liver apoptosis in rats. **Chin J Nat Med.**, Jul;11(4)(1875-5364 (Electronic)).
- Anbu, S., ve Anuradha, C., 2012. Protective effect of eugenol against alcohol-induced biochemical changes in rats. **International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry**, 2(2), 13-18.

- Ayala, A., Muñoz, M. F., ve Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 360438-360438. doi:10.1155/2014/360438
- Ballard, H. S., 1997. The hematological complications of alcoholism. **Alcohol Health Res World**, 21(1)(0090-838X (Print)), 42-52.
- Bang, S., Park, S., Lee, Y. M., Hong, S., Cho, K. B., ve Nam, W., 2014. Demonstration of the heterolytic O-O bond cleavage of putative nonheme iron(II)-OOH(R) complexes for Fenton and enzymatic reactions. **Angew Chem Int Ed Engl**, 53(30), 7843-7847. doi:10.1002/anie.201404556
- Barbosa, M. L., de Meneses, A.-A. P. M., de Aguiar, R. P. S., de Castro e Sousa, J. M., de Carvalho Melo Cavalcante, A. A., ve Maluf, S. W., 2020. Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, 36, 65-72. doi:https://doi.org/10.1016/j.npbr.2020.02.006
- Barboza, J., da Silva, M. B. F. C., Silva, R., Medeiros, J., ve de Sousa, D. 2018 An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. . **Oxid Med Cell Longev**. . doi:doi: 10.1155/2018/3957262
- Bennett, A., Stamford, I. F., Tavares, I. A., Jacobs, S., Capasso, F., Mascolo, N., Autore, G., Romano, V., ve Carlo, G. D., 1988. The biological activity of eugenol, a major constituent of nutmeg (*Myristica fragrans*): Studies on prostaglandins, the intestine and other tissues. **Phytotherapy Research**, Volume2(Issue3), 124-130.
- Bertola, A., 2018. Rodent models of fatty liver diseases. **Liver Research**, 2(1), 3-13. doi:https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.03.001
- Blanco, A., ve Blanco, G., 2017. Chapter 10 - Antioxidants. In A. Blanco ve G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry: Academic Press* (pp. 205-214).
- Bourogaa, E., Jarraya, R., Nciri, R., Damak, M., ve Elfeki, A., 2014. Protective effects of aqueous extract of *Hammada scoparia* against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. **Toxicol Ind Health**, 30(2), 113-122.
- Bourogaa, E., Nciri R Fau - Mezghani-Jarraya, R., Mezghani-Jarraya R Fau - Racaud-Sultan, C., Racaud-Sultan C Fau - Damak, M., Damak M Fau - El Feki, A., ve El Feki, A., 2013. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Hammada scoparia* against ethanol-induced liver injury in rats. **J Physiol Biochem**, 69(2)(1877-8755 (Electronic)), 227-237.
- Buldak, R. J., Buldak, L., Kukla, M., Gabriel, A., ve Zwirska-Korczala, K., 2014. Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression. **Pol J Pathol**, 65(3), 167-175.
- Cederbaum, A. I., 2012. Alcohol metabolism. **Clinics in liver disease**, 16(4), 667-685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002
- Chattopadhyay, R. R., 2003. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. **J. Ethnopharmacol**, 89(2-3), 217-219.

- Cheng, N., Du, B., Wang, Y., Gao, H., Cao, W., Zheng, J., ve Feng, F., 2014. Antioxidant properties of jujube honey and its protective effects against chronic alcohol-induced liver damage in mice. **Food & function**, 5. doi:10.1039/c3fo60623f
- Christen, Y., 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease. **Am J Clin Nutr**, 71(2), 621S-629S.
- Chrostek, L., Tomaszewski, W., ve Szmitkowski, M. 2005., The effect of green tea on the activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the liver of rats during chronic ethanol consumption. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)**, 50, 220-223.
- Collin, F., 2019. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. **International journal of molecular sciences**, 20(10), 2407. doi:10.3390/ijms20102407
- Coşkun, G., ve Özgür, H., 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması . **Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, 20 (3), 145-158.
- Dahiru, D., ve Obidoa, O., 2007. Evaluation of the antioxidant effects of Ziziphus mauritiana Lam. Leaf extracts against chronic ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM**, 5(1), 39-45. doi:10.4314/ajtcam.v5i1.31254
- Das, M., Basu, S., Banerjee, B., Sen, A., Jana, K., ve Datta, G., 2018 Hepatoprotective effects of green Capsicum annum against ethanol induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. **J Ethnopharmacol**, 5;227, 69-81.
- Dede, F., Kos, M., Bukan, N., Sener, D., Demir, M., Aydin, O., Arhan, M., ve Eskioglu, E., 2011. The evaluation of oxidative stress parameters in chronic viral hepatitis/Kronik viral hepatitli hastalarda oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi. **Istanbul Medical Journal**, 12(4), 175-181.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., ve Pandian, S. K., 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, 130(1), 107-115. doi:https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.025
- Dianzani, M. U., 1992. Free radicals in physiology and pathology. **Boll Soc Ital Biol Sper**, 68(8-9), 491-511.
- Dighe, V., Gursale, A., Sane, R., Menon, S., ve Raje, S., 2005. Quantification of eugenol in Cinnamomum tamala nees and eberm. Leaf powder by high-performance thin-layer chromatography. **JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, 18(104), 305-307. doi:10.1556/jpc.18.2005.4.10
- Dogan, A., ve Celik, I., 2011. Hepatoprotective and antioxidant activities of grapeseeds against ethanol-induced oxidative stress in rats. **British Journal of Nutrition**, 107(1), 45-51. doi:10.1017/S0007114511002650
- Doğan, A., ve O. O., A., 2019 Investigation of the phytochemical composition and antioxidant properties of chinara (Platanus orientalis L.) leaf infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Mol Biol Rep**, 46(3)(1573-4978 (Electronic)), 3049-3061.

- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Du, J., He, D., Sun, L., Han, T., Zhang, H., Qin, L.-P., ve Rahman, K., 2010. Semen *Hoveniae* extract protects against acute alcohol-induced liver injury in mice. **Pharmaceutical biology**, 48, 953-958. doi:10.3109/13880200903300196
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., ve Merillon, J. M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **J Agric Food Chem**, 57(5), 1768-1774. doi:10.1021/jf803011r
- Durak, I., Yurtarslan, Z., Canbolat, O., ve Akyol, Ö., 1993. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. **Clinica Chimica Acta**, 214(1), 103-104.
- Elanchezhian, E., Yoganandh, T., Mayilsamy, S., Shankar, R., 2017. Comparison of haematological parameters between alcoholics and nonalcoholics. **International Journal of Research in Medical Sciences**. Nov;5(11):5041-5047.
- El-Newary, S. A., Shaffie, N. M., ve Omer, E. A., 2017. The protection of *Thymus vulgaris* leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10(4), 361-371. doi:https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.023
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clinical Biochemistry**, 37(2), 112-119. doi:https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, 38(12), 1103-1111. doi:https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008
- Eşmekaya, M. A., SIRAV, B., Çiğdem, Ö., ve Seyhan, N., 2011. Radyofrekans Radyasyonun Sıçanların Beyin Dokusundaki Oksidan ve Antioksidan Düzeylerine Etkisi. **Gazi Medical Journal**, 22(4).
- EWG., (2018). <http://www.ewg.org/skindeep/search.php?query=eugenol&h=Search#.Wr36zeZrOIV>. Retrieved 10.02.2018, from Environmet Working Group
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Bernsten, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., ve Van Dorland, R., 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing Chapter 2. **United Kingdom: Cambridge University Press**.
- Frezza, M., di Padova, C., Pozzato, G., Terpin, M., Baraona, E., ve Lieber, C. S., 1990. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. **N. Engl. J. Med.**, 322(2), 95-99. doi:10.1056/nejm199001113220205
- Fromenty, B., Vadrot N Fau - Massart, J., Massart J Fau - Turlin, B., Turlin B Fau - Barri-Ova, N., Barri-Ova N Fau - Lettéron, P., Lettéron P Fau - Fautrel, A., Fautrel A Fau - Robin, M.-A., ve Robin, M. A., 2009. Chronic ethanol consumption lessens

- the gain of body weight, liver triglycerides, and diabetes in obese ob/ob mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 331(1)(1521-0103 (Electronic)), 23–34.
- Galicia-Moreno, M., ve Gutierrez-Reyes, G., 2014. The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. **Rev Gastroenterol Mex**, 79(2), 135-144. doi:10.1016/j.rgm.2014.03.001
- Gao, B., ve Bataller, R., 2011. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets, **Gastroenterology**. 141(5), 1572-1585.
- Ghosh, N., Das, A., Chaffee, S., Roy, S., ve Sen, C. K., 2018. Chapter 4 - Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. In S. Chatterjee, W. Jungraithmayr, ve D. Bagchi (Eds.), *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Academic Press* (pp. 45-55).
- Gonçalves, L. C. P., Massari, J., Licciardi, S., Prado, F. M., Linares, E., Klassen, A., Tavares, M. F. M., Augusto, O., Di Mascio, P., ve Bechara, E. J. H., 2020. Singlet oxygen generation by the reaction of acrolein with peroxyxynitrite via a 2-hydroxyvinyl radical intermediate. **Free Radical Biology and Medicine**, 152, 83-90. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.003
- Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Diaz, C. E., ve Fraga, B. M., 2010. 3.09 - Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. In H.-W. Liu ve L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II Oxford: Elsevier* (pp. 237-268).
- Goorden, S. F. B., E., T., Buffart Te Fau - Bakker, A., Bakker A Fau - Buijs, M. M., ve Buijs, M. M., 2013. Liver disorders in adults: ALT and AST. [Leveraandoeningen bij volwassenen: ALAT en ASAT.]. **Ned Tijdschr Geneesk.**, 157(1876-8784 (Electronic)).
- Guan, Y.-S., ve He, Q., 2015. Plants consumption and liver health. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.
- Guénette, S. A., Ross A Fau - Marier, J.-F., Marier Jf Fau - Beaudry, F., Beaudry F Fau - Vachon, P., ve Vachon, P., 2007. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. **European journal of pharmacology**, 562(1-2)(0014-2999 (Print)), 60–67.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., ve Aboul-Enein, H. Y., 2012. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, 5(4), 489-499. doi:https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.016
- Halder, S., Mehta, AK., Kar, R., Mustafa, M., Mediratta, PK., Sharma, KK., 2011. Clove oil reverses learning and memory deficits in scopolamine-treated mice. **Planta Med.** May;77(8):830-4. doi: 10.1055/s-0030-1250605. Epub 2010 Dec 14. PMID: 21157682.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, 91(3, Supplement 3), S14-S22. doi:https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7
- Howes, M. J., Kite, G. C., ve Simmonds, M. S., 2009. Distinguishing chinese star anise from Japanese star anise using thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, 57(13), 5783-5789. doi:10.1021/jf9009153

- Ignarro, L. J. 2014. Nitric Oxide. In Reference Module in Biomedical Sciences: **Elsevier**.
- Johnson, C. B., Kirby, J., Naxakis, G., ve Pearson, S., 1999. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Phytochemistry**, 51(4), 507-510. doi:https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00767-5
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., ve Viljoen, A. M., 2012. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**, 17(6), 6953.
- Kamm, A., Przychodzen, P., Kuban-Jankowska, A., Jacewicz, D., Dabrowska, A. M., Nussberger, S., Wozniak, M., ve Gorska-Ponikowska, M., 2019. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. **Nitric Oxide**, 93, 102-114. doi:https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.005
- Karabulut, H., ve Gulay, M. Ş., 2016a. Serbest Radikaller. **MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.**, 4, 50-59.
- Karabulut, H., ve Gülay, M. Ş., 2016b. ANTİOKSİDANLAR. **Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**.
- Kasdallah-Grissa, A., Nakbi, A., Koubaa, N., El-Fazaâ, S., Gharbi, N., Kamoun, A., ve Hammami, M., 2008. Dietary virgin olive oil protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in the liver of rats chronically exposed to ethanol. **Nutrition Research**, 28(7), 472-479. doi:https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.03.014
- Kawashima, Y., Someya, Y., Shirato, K., Sato, S., Ideno, H., Kobayashi, K., ve Imaizumi, K., 2011. Single administration effects of ethanol on the distribution of white blood cells in rats. **J. Toxicol Sci.**, 36(3), , 347-355.
- Kwon, D. Y., Kim, S. J., Lee, J. W., ve Kim, Y. C., 2010. Comparison of hydroxyl radical, peroxy radical, and peroxynitrite scavenging capacity of extracts and active components from selected medicinal plants. **Toxicological research**, 26(4), 321-327. doi:10.5487/TR.2010.26.4.321
- Li, R., Jia, Z., ve Trush, M. A., 2016. Defining ROS in Biology and Medicine. **Reactive oxygen species (Apex, N.C.)**, 1(1), 9-21. doi:10.20455/ros.2016.803
- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., ve Feng, Y., 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International journal of molecular sciences**, 16(11), 26087-26124. doi:10.3390/ijms161125942
- Longo, B., Sommerfeld, E. P., dos Santos, A. C., da Silva, R. d. C. M. V. d. A. F., Somensi, L. B., Mariano, L. N. B., Boeing, T., Faloni de Andrade, S., de Souza, P., ve da Silva, L. M., 2021. Dual role of eugenol on chronic gastric ulcer in rats: Low-dose healing efficacy and the worsening gastric lesion in high doses. **Chemico-Biological Interactions**, 333, 109335. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109335
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., ve Kolodziejczyk, P. P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia*

essential oils. **Phytochemistry**, 69(8), 1732-1738.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>

- Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., ve Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, 14(4), 840-860. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
- Lucero López, V. R., Razzeto, G. S., Giménez, M. S., ve Escudero, N. L., 2011. Antioxidant Properties of Amaranthus hypochondriacus Seeds and their Effect on the Liver of Alcohol-Treated Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, 66(2), 157-162. doi:10.1007/s11130-011-0218-4
- Maffei, F., Angeloni, C., Malaguti, M., Moraga, J. M., Pasqui, F., Poli, C., Colecchia, A., Festi, D., Hrelia, P., ve Hrelia, S., 2011. Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk. **Mutat Res**, 714(1-2), 88-92. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.06.016
- Mainnemare, A., Mégarbane, B., Soueidan, A., Daniel, A., ve Chapple, I. L., 2004. Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. **J Dent Res**, 83(11), 823-831. doi:10.1177/154405910408301101
- Müller, L. G., Pase Cs Fau - Reckziegel, P., Reckziegel P Fau - Barcelos, R. C. S., Barcelos Rc Fau - Boufleur, N., Boufleur N Fau - Prado, A. C. P., Prado Ac Fau - Fett, R., Fett R Fau - Block, J. M., Block Jm Fau - Pavanato, M. A., Pavanato Ma Fau - Bauermann, L. F., Bauermann Lf Fau - da Rocha, J. B. T., da Rocha Jb Fau - Burger, M. E., ve Burger, M. E. 2013. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, 65(1-2)(1618-1433 (Electronic)), 165–171.
- Murphy, M. P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical journal**, 417(1), 1-13. doi:10.1042/BJ20081386
- Na, H. K., ve Lee, J. Y., 2017. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(6), 1116. doi:10.3390/ijms18061116
- NCBI. (2018). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3314>. Retrieved Mar. 29. 2018., from PubChem Compound Database
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., ve Yar, M. S., 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 178, 687-704. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G., ve Smith, M. A., 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 65(7), 631-641. doi:10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf
- Nyblom, H., Berggren, U., Balldin, J., ve Olsson, R., 2004. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, 39, 336-339. doi:10.1093/alcalc/agh074

- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. **Journal of Clinical & Experimental Investigations**, 6(3), 331-336. doi:10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545
- Özel, G., ve Birdane, Y., 2014. Antioxidants. **Kocatepe Veterinary Journal**, 41-52. doi:10.5578/kvj.8486
- Ozsürekci, Y., ve Aykac, K., 2016. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016, 2768365-2768365. doi:10.1155/2016/2768365
- Paglia, D. E., ve Valentine, W. N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, 70(1), 158-169.
- Pandanaboina, S. C., Kondeti, S. R., Rajbanshi, S. L., Kunala, P. N., Pandanaboina, S., Pandanaboina, M. M., ve Wudayagiri, R., 2012. Alterations in antioxidant enzyme activities and oxidative damage in alcoholic rat tissues: protective role of *Thespesia populnea*. **Food Chem**, 132(1), 150-159. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.046
- Pari, L., ve Suresh, A., 2008. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 46(5), 1627-1634. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.003
- Park, H., Lee, S., Song, Y., Jang, S., Ko, Y., Kang, S., Chung, B., Kim, H., Kim, G., ve Cho, J., 2014 *Schisandra chinensis* prevents alcohol-induced fatty liver disease in rats. **J Med Food**, 17(1), 103-110.
- Parker, A. E., Monks, P. S., Wyche, K. P., Balzani-Lööv, J. M., Staehelin, J., Reimann, S., Legreid, G., Vollmer, M. K., ve Steinbacher, M., 2009. Peroxy radicals in the summer free troposphere: seasonality and potential for heterogeneous loss. **Atmos. Chem. Phys.**, 9(6), 1989-2006. doi:10.5194/acp-9-1989-2009
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., ve Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, 30(1), 11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- Pragadheesh, V., Yadav, A., Singh, S., Gupta, N., ve Chanotiya, C., 2013. Leaf Essential Oil of Cultivated *Pimenta Racemosa* (Mill.) J.W. Moore from North India: Distribution of Phenylpropanoids and Chiral Terpenoids. **Medicinal & Aromatic Plants**, 2:1.
- Prakash, B., Priya, N., S, A., R C, V., ve Nair, H., 2018. Protective Effects of Eugenol against Hepatotoxicity Induced by Arsenic Trioxide: An Antileukemic Drug. **Iranian Journal of Medical Sciences**, 43, 305-312.
- Rác, M., Křupka, M., Binder, S., Sedlářová, M., Matušková, Z., Raška, M., ve Pospíšil, P., 2015. Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. **PloS one**, 10(3), e0116958-e0116958. doi:10.1371/journal.pone.0116958
- Rakonczay, Jr., Z., Boros I Fau - Jármai, K., Jármai K Fau - Hegyi, P., Hegyi P Fau - Lonovics, J., Lonovics J Fau - Takacs, T., ve Takacs, T., 2003. Ethanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to

- induce heat-shock proteins in rats. **J Gastroenterol Hepatol.**, 18(7)(0815-9319 (Print)), 858-867.
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., ve Qin, L., 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. (1600-079X (Electronic)).
- Rhee, S. G., 2006. Cell signaling. **H2O2, a necessary evil for cell signaling. Scienc e**, 312, 1882-1883.
- Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., ve Berra, B., 2010. Endogenous antioxidants and radical scavengers. **Adv Exp Med Biol**, 698, 52-67. doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_5
- Rozanowska, M., Cantrell, A., Edge, R., Land, E. J., Sarna, T., ve Truscott, T. G., 2005. Pulse radiolysis study of the interaction of retinoids with peroxyl radicals. **Free Radic Biol Med**, 39(10), 1399-1405. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.018
- Saki, H., Goudarzi, G., Jalali, S., Barzegar, G., Farhadi, M., Parseh, I., Geravandi, S., Salmanzadeh, S., Yousefi, F., ve Mohammadi, M. J., 2020. Study of relationship between nitrogen dioxide and chronic obstructive pulmonary disease in Bushehr, Iran. **Clinical Epidemiology and Global Health**, 8(2), 446-449. doi:https://doi.org/10.1016/j.cegh.2019.10.006
- Sam, C.-H., ve Lu, H.-K., 2009. The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. **Journal of Dental Sciences**, 4(2), 45-54. doi:https://doi.org/10.1016/S1991-7902(09)60008-8
- Sciorsci, R. L., Lillo, E., Occhiogrosso, L., ve Rizzo, A., 2020. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, 130, 240-246. doi:https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.026
- Seitz, H. K., ve Becker, P., 2007. Alcohol metabolism and cancer risk. **Alcohol Res Health**, 30(1), 38-41, 44-37.
- Seven, A., ve Candan, G., 1996. Antioksidant defense systems. **Cerrahpasa J Med.**, 27, 41-50.
- Shichiri, M., Yoshida, Y., ve Niki, E., 2014. Unregulated Lipid Peroxidation in Neurological Dysfunction. In R. R. Watson ve F. De Meester (Eds.), **Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health Boston: Academic Press** (pp. 31-55).
- Shukri, R., Mohamed, S., ve Mustapha, N. M., 2010. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, 122(4), 1116-1121. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.094
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, 82(2), 291-295.
- Sifuentes-Franco, S., Pacheco-Moisés, F. P., Rodríguez-Carrizalez, A. D., ve Miranda-Díaz, A. G., 2017. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. **Journal of diabetes research**, 2017, 1673081-1673081. doi:10.1155/2017/1673081

- Siwek, M., Sowa-Kucma, M., Dudek, D., Styczen, K., Szewczyk, B., Kotarska, K., Misztak, P., Pilc, A., Wolak, M., ve Nowak, G., 2013. Oxidative stress markers in affective disorders. **Pharmacol Rep**, 65(6), 1558-1571.
- Slukvin, I. I., Boor, P. J., ve Jerrells, T. R., 2001. Initiation of alcoholic fatty liver and hepatic inflammation with a specific recall immune response in alcohol-consuming C57Bl/6 mice. **Clinical and experimental immunology**, 125(1), 123-133. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01529.
- Sonila, B., Klodeta, M., Andrin, T., ve Irida, P., 2015. Changes of some blood count variables in correlation with the time of alcohol abuse. **Journal of Addiction Research & Therapy**, 6(2), 221.
- Stewart, S. F., & Day, C. P., 2004. Alcoholic Liver Disease. **Principles of Medical Biology**, 317-359.
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., ve Peng, Z.-Y., 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019, 5080843-5080843. doi:10.1155/2019/5080843
- Szkudelska, K., Deniziak, M., Roś P, G., K., ve Szkudelski, T., 2017 Resveratrol alleviates ethanol-induced hormonal and metabolic disturbances in the rat. . **Physiol Res.**, 66(1), 135-145.
- Thuwaini, M., Abdul Mounther, O., ve Mohammed Kadhém, H., 2018. "Hepatoprotective Effects Of The Aqueous Extract Of Clove (Syzygium aromaticum) Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity And Oxidative Stress In Rats" 1. 4, 161-167.
- TOXNET, T. D. N., (2018). Eugenol [USP]. Retrieved 15.03.2018, from National Library of Medicine
- Tripathi, A. K., ve Mishra, S., 2016. Chapter 16 - Plant Monoterpenoids (Prospective Pesticides). In *Ecofriendly Pest Management for Food Security* **San Diego: Academic Press** (pp. 507-524).
- Tsukamoto H., Horne W., Kamimura S., Niemelä O., Parkkila S., Ylä-Herttuala S, Brittenham GM., 1995. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. **J Clin Invest.**, Jul;96(1):620-30. doi: 10.1172/JCI118077.
- Tuma DJ., Thiele GM., Xu D., Klassen LW., Sorrell MF., 1996. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. **Hepatology**. Apr;23(4):872-80. doi: 10.1002/hep.510230431.
- Turrens, J. F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, 552(Pt 2), 335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R. R., Morgado-Díaz, J. A., Korehisa Maza, P., Prado Dias Filho, B., Aparício Garcia Cortez, D., Alviano, D. S., Rosa, M. d. S. S., Lopes, A. H. C. S., Alviano, C. S., ve Nakamura, C. V., 2006. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, 55(2), 99-105. doi:https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., ve Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160(1), 1-40. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vonlaufen, A., Wilson, J. S., Pirola, R. C., ve Apte, M. V., 2007. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. **Alcohol Res Health**, 30(1), 48-54.
- Wagner, B. A., Reszka, K. J., McCormick, M. L., Britigan, B. E., Evig, C. B., ve Patrick Burns, C., 2004. Role of Thiocyanate, Bromide and Hypobromous Acid in Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis. **Free Radical Research**, 38(2), 167-175. doi:10.1080/10715760310001643302
- Wang, Y., Xue, Y., ve Zhang, C., 2020. Generation and application of reactive chlorine species by electrochemical process combined with UV irradiation: Synergistic mechanism for enhanced degradation performance. **Science of The Total Environment**, 712, 136501. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136501>
- Wasowicz, W., Neve, J., ve Peretz, A., 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clinical Chemistry**, 39(12), 2522-2526.
- Wen, Q., ve Chen, Q., 2020. An Overview of Ozone Therapy for Treating Foot Ulcers in Patients With Diabetes. **The American Journal of the Medical Sciences**. doi:<https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.05.012>
- WHO, W. H. O., (2018). Global status report on alcohol and health 2018. Retrieved 24.09.2019 <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>
- Wickens, A. P., 2001. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, 128(3), 379-391. doi:[https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00313-9)
- Wilson, G., ve Garthwaite, J., 2009. Nitric Oxide. In L. R. Squire (Ed.), Encyclopedia of Neuroscience **Oxford: Academic Press** (pp. 1151-1156).
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., ve Wood, N. W., 2006. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. **Trends Mol Med**, 12(11), 521-528. doi:10.1016/j.molmed.2006.09.007
- Wu, Z., Fang, J., Xiang, Y., Shang, C., Li, X., Meng, F., ve Yang, X., 2016. Roles of reactive chlorine species in trimethoprim degradation in the UV/chlorine process: Kinetics and transformation pathways. **Water Research**, 104, 272-282. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.011>
- Xiao, W., 1998. Study on the joint effects of acrylonitrile and alcohol in rats. **Journal of hygiene research**, 27(5), 295-296.
- Ximenes, V. F., Morgon, N. H., ve de Souza, A. R., 2015. Hypobromous acid, a powerful endogenous electrophile: Experimental and theoretical studies. **J Inorg Biochem**, 146, 61-68. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.02.014
- Yalçın, M., ve Yağcı, A., 2005. Alterations in Some Blood Parameters After High Level Ethanol Intake. **Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 24 (1-2-3-4) 47-52.

- Yogalakshmi, B., Viswanathan, P., ve Anuradha, C. V., 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, 268(3), 204-212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.018>
- Young, I. S., ve Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, 54(3), 176. doi:10.1136/jcp.54.3.176
- Yurt, B., ve Celik, I., 2011. Hepatoprotective effect and antioxidant role of sun, sulphited-dried apricot (*Prunus armeniaca* L.) and its kernel against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 49(2), 508-513. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.035>

