

**Yakıotunun Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin
ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Proteomik ve
Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması**

Proje No: 109R012

Prof. Dr. Orhan ADALI

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Doç.Dr. Hakan AKÇA

Doç.Dr. Ayşe Mine GENÇLER- ÖZKAN

Aslı SEMİZ

Serdar KARAKURT

Gurbet ÇELİK

MAYIS 2012

ANKARA

ÖNSÖZ

1990'lı yılların başlarında sadece Amerika Birleşik Devletlerinde tedavi veya koruyucu amaçlı kullanılan bitkisel ürünlere harcanan paranın 19 Milyar Dolar olduğu bildirilmekte ve bu rakamın kullanıcı sayısının arttığı göz önüne alındığında günümüzde çok daha yüksek rakamlara ulaştığı tahmin edilmektedir. Günümüzde alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artmakla hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle ülkemizde bitkilerden çeşitli yollarla elde edilen ekstraktlar genel olarak iyileşmeyi sağlamak veya koruyucu amaçlar için gittikçe artan bir popülerite ile kullanılmaktadır. Ancak halk arasındaki bu preparatların doğal olduğu ve zararsız olduğu inancının aksine bu preparatların eş zamanlı olarak gıdalar, çevreden alınan kimyasallar veya diğer tıbbi ilaçlar ile etkileşerek hayati tehlike arz eden zararlar oluşturmalarıdır. Bu nedenle, alternatif tedaviler için halk arasında kullanılan bitkisel preparatların detaylı bir şekilde çalışılarak yararlı ve zararlı etkilerinin tanımlanması önem arz etmektedir.

Önerilen araştırma konusu, fitokimyasal bileşenleri bilinen ve ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak kullanılan tüylü yakıotu (*Epilobium hirsutum* L.) bitkisinin tedavi edici (antikarsinojenik, antioksidan, antiöstrojenik, tümör baskılayıcı vb.), koruyucu (antioksidan vb.) veya zararlı etkilerinin (karsinojen, oksidan, tümör promotör vb.) etki mekanizmaları ile birlikte moleküler düzeyde saptanmasını kapsamaktadır. Bu kapsamda tüylü yakıotu ekstresinin karsinojen ve mutajen maddeler, çevresel kirlenmeler ve ilaçlar gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan ve önem arz eden enzimlerin gen, protein ve aktivite düzeylerine olan etkileri çalışılmış ve olası etkileşim mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu anlamda bitki seçiminde öncelikle halk arasında kullanılan, özellikle polifenolik bileşik içerikleri bilinen ve literatürde üzerinde ksenobiyotik metabolizması ile ilgili veri olmayan veya çok az olan türler kriter olarak alınmıştır. Çünkü bu çalışma, bir aktif bileşen izolasyonu ve karakterizasyonu çalışması değil aksine -halkın kullandığı şekilde, ekstre halinde [tüm preparatın (drog)]- etki mekanizmalarının tanımlanmasını kapsayan bir araştırmadır. Bu nedenle Anadolu'da çeşitli semptomların giderilmesi amacı ile kullanılan ve üzerinde önerilen proje konusu ile ilgili hemen hemen hiç çalışma bulunmayan tüylü yakıotu seçilmiştir.

Çalışmanın sonuçları tüylü yakıotunun uygun dozlarda kullanıldığında kanser dâhil çeşitli hastalıklar için kullanılabilir çok önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni ve alternatif koruyucu ve/veya destek etmeni olduğunu göstermektedir.

TÜBİTAK 109R012 no'lu kodu ile bu çalışmayı desteklemiştir. TÜBİTAK'a destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Prof. Dr. Orhan ADALI

İÇİNDEKİLER

ÖZET	12
ABSTRACT	14
1. GİRİŞ.....	16
1.1. Sitokrom P450 (CYP450) ve Fitokimyasal Etkileşimleri.....	17
1.2. Faz II enzimleri [Glutasyon S-Transferazlar (GST) ve Kinon Redüktazlar (NQO1)] ve Fitokimyasal Etkileşimleri	20
1.3. Fitokimyasallar.....	21
1.3.1. Polifenoller.....	22
1.3.1.1. Flavonoidler.....	22
1.3.1.2. Alkaloidler.....	23
1.3.1.3. Terpenoidler	24
1.3.1.4. Antrakınonlar	24
1.4. Projede Kapsamında Çalışılacak Bitki.....	25
1.4.1. Tüylü Yakıotu [<i>Epilobium hirsutum</i> L. (Onagraceae)]:	26
2. MATERYAL ve METOT	28
2.1. Tüylü Yakıotunun Toplanması.....	28
2.2. Ekstrenin Hazırlanması ve Ana Etken Maddelerin Tanımlanması.....	29
2.2.1. Ekstrenin hazırlanma yöntemleri	29
2.2.2. Etken Bileşiklerin Teşhisleri (Kalitatif-Niteliksel)	29
2.2.2.1. Alkaloid teşhisi.....	29
2.2.2.2. Kardiyoaktif heterozit teşhisi.....	30
2.2.2.3. Saponozit teşhisi	30
2.2.2.4. Flavonoidlerin teşhisi	30
2.2.2.5. Antosiyanozit teşhisi	31
2.2.2.6. Siyanogenetik heterozit teşhisi	31
2.2.2.7. Tanen teşhisi	31
2.2.2.8. Antrasen teşhisi.....	32
2.2.2.9. Kumarin teşhisi.....	32
2.2.2.10. Uçucu yağ teşhisi	32
2.2.3. Tüylü Yakıotunun Standardize Edilmesi	32

2.2.3.1 Tüylü Yakıotu Ekstresinin FTIR Analizi.....	33
2.4. Ekstrenin Deneklere Uygulanması	33
2.4.1. Enjeksiyon Aşaması- <i>in vivo</i> Hayvan Çalışmaları.....	33
2.4.2. Dokuların Temini	34
2.5. Ekstrenin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Saptanması	35
2.5.1. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması	35
2.5.1.1. Sitololik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi.....	35
2.5.1.2. Protein Tayini	36
2.5.1.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Tayini (CYP2E1)	36
2.5.1.4. N-Demetilaz Aktivite Tayinleri.....	37
2.5.1.5. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktiviteleri Tayini.....	40
2.5.1.6. Sitololik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini	41
2.5.1.7. Sitololik Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivite Tayini	42
2.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması.....	43
2.6.1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini.....	43
2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	43
2.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini	44
2.7. Diagnostik (Sitotoksik) Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması.....	44
2.7.1. Serum Aminotransferazların (Aspartat ve Alanin)Tayini: (AST ve ALT)	44
2.7.2. Serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Tayini	45
2.8. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması	45
2.8.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi	45
2.8.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi	47
2.9. Ekstrenin Genotoksik Etkilerinin Saptanması	50
2.9.1. Hücre Kültürü ve Tüylü Yakıotu Ekstresinin Uygulanması	50
2.9.2. Tüylü Yakıotu ekstresinin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi:	51
2.10. Ekstrenin Karaciğer Tüm Doku PROTein Profillerine (PROTEOM) Etkilerinin Saptanması	52
2.10.1. Tüm Doku (Karaciğer) Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması.....	52
2.10.2. Karaciğer Total Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması.....	52

2.10.3. İlk Boyut-İzoelektrik Odaklama (IEF)	53
2.10.4. İkinci Boyut: SDS-PAJE.....	54
2.10.5. Jellerin Boyanması-Proteinlerin Dedeksiyonu	54
2.10.6. Jellerin Analizi	54
2.10.7. Proteinlerin Tanımlanması.....	55
2.11. İstatiksel Analizler.....	55
3. BULGULAR.....	56
3.1. Yakı Otunun (<i>Epilobium hirsutum</i>) Etken Bileşiklerinin Teşhisi	56
3.1.1. YakıotuYakıotunun Etken Bileşiklerinin Niceliksel Teşhisleri.....	56
3.1.2. Yakıotunun Rutin Analizleri (LC-MS Analizi) ve FTIR Spectrumu	57
3.2. Enjeksiyon Aşaması – <i>in vivo</i> Hayvan Çalışmaları	57
3.3. Fraksiyonların Protein Değerleri	59
3.4. Yakıotunun (<i>Epilobium hirsutum</i> , EHT) Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması	61
3.4.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesi (A4H)	61
3.4.2. Aromataz Aktivitesi (DBFOD)	63
3.4.3. N-Demetilaz Aktiviteleri	65
3.4.3.1. Aminopiren N-Demetilaz.....	65
3.4.3.2. Benzfetamin N-Demetilaz (BPND)	68
3.4.3.3. Eritromisin N-Demetilaz (ERND)	70
3.4.3.4. Etilmorfin N-Demetilaz (EmND).....	72
3.4.3.5. Kafein N-Demetilaz (C3ND)	74
3.4.3.6. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA).....	76
3.4.4. Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri.....	78
3.4.4.1. Benziloksirezorufin O-Dealkilaz (BROD) Aktivitesi	78
3.4.4.2. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivitesi	80
3.4.4.3. Metoksirezorufin O-Dealkilaz (MROD) Aktivitesi	82
3.4.4.4. Pentiloksirezorufin O-Dealkilaz (PROD) Aktivitesi	84
3.4.4.5. N-Nitrosa Kinon OxidoRedüktaz (NQO1) Aktivitesi	86
3.4.4.6. Glutasyon S-Transferaz Aktiviteleri	88
3.4.4.6.1. GST- CDNB.....	88

3.4.4.6.2. GST- DCNB.....	90
3.4.4.6.3. GST- EA.....	91
3.4.4.6.4. GST- EPNP	93
3.4.4.7. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.....	95
3.4.4.7.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	95
3.4.4.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	97
3.4.4.7.3. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivitesi	99
3.4.4.8. Diagnostik Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması	101
3.4.4.8.1. Kan Serum Aminotransferazların Aktiviteleri: (AST ve ALT).....	101
3.4.4.8.2. Kan Serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesi.....	104
3.5. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması	107
3.5.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi	107
3.5.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR	109
3.6. Tüylü Yakı otu Ekstresinin Hücre Kültürlerine Uygulanması.....	117
3.6.1. Tüylü Yakı otunun Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkileri	117
3.6.1.1. İnsan Embriyonik Böbrek 293 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisi	117
3.6.2. İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi	118
3.6.3. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 Hücreleri Üzerindeki Etkisi.....	119
3.6.4. İnsan Embriyonik Fibroblast 3T3 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisi.....	120
3.6.2. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi	121
3.7. Ekstrenin Karaciğer Tüm Doku Protein Profillerine (PROTEOM) Etkilerinin Saptanması	123
4. TARTIŞMA.....	128
5. KAYNAKLAR	140

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Çok evreli bir süreç olan karsinogenezin fitokimyasallarca bloke edilmesi veya baskılanması (Chen ve Kong, 2004'ten adapte edilmiştir).....	19
Şekil 2. Tüylü yakıotu (<i>Epilobium hirsutum</i>).....	26
Şekil 3. Anilin 4-hidroksilasyonu	37
Şekil 4. N-nitrosodimetilamin N-demetilasyonu	37
Şekil 5. Kafein N-demetilasyonu.....	37
Şekil 6. Eritromisin N-demetilasyonu	38
Şekil 7. Aminopiren N-demetilasyonu.....	38
Şekil 8. Etilmorfin N-demetilasyonu	38
Şekil 9. Alkoksirezorufin dealkilasyonu	40
Şekil 10. GST-CDNB enzimatik reaksiyonu.....	41
Şekil 11. NQO1 enzimatik reaksiyonu	42
Şekil 12. GPX enzimatik reaksiyonu	44
Şekil 13. Denek bilgileri	59
Şekil 14. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H)	63
Şekil 15. Aromataz aktivitesi (DBFOD).....	65
Şekil 16. Aminopiren N-demetilaz aktivitesi (APND).....	67
Şekil 17. Benzfetamin N-demetilaz aktivitesi (BPND).....	69
Şekil 18. Eritromisin N-demetilaz (ERND)	71
Şekil 19. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi (EmND)	73
Şekil 20. Kafein N-demetilaz aktivitesi (C3ND).....	75
Şekil 21. NDMA aktivitesi.....	77
Şekil 22. BROD aktivitesi.....	79
Şekil 23. EROD aktivitesi.....	81
Şekil 24. MROD aktivitesi	83
Şekil 25. PROD aktivitesi.....	85
Şekil 26. NQO1 aktivitesi	87
Şekil 27. GST- CDNB aktivitesi	89
Şekil 28. GST- DCNB aktivitesi	91
Şekil 29. GST-EA aktivitesi.....	93

Şekil 30. GST- EPNP aktivitesi.....	95
Şekil 31. Katalaz aktivitesi	97
Şekil 32. SOD aktivitesi	99
Şekil 33. GPX aktivitesi.....	101
Şekil 34. ALT aktivitesi.....	103
Şekil 35. AST aktivitesi	103
Şekil 36. LDH aktivitesi	105
Şekil 37. Tüylü yakıotunun sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzimler üzerindeki etkilerinin western blot görüntüleri	108
Şekil 38. CYP1A1 mRNA.....	111
Şekil 39. CYP1A2 mRNA.....	111
Şekil 40. CYP2C6 mRNA	112
Şekil 41. CYP2D mRNA	112
Şekil 42. CYP2E1 mRNA.....	113
Şekil 43. CYP2J4 mRNA	113
Şekil 44. CYP3A4 mRNA.....	114
Şekil 45. CYP4A mRNA.....	114
Şekil 46. GPX mRNA.....	115
Şekil 47. GST-Tetha mRNA.....	115
Şekil 48. GST-Mu mRNA.....	116
Şekil 49. NQO1 mRNA	116
Şekil 50. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	118
Şekil 51. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	119
Şekil 52. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	120
Şekil 53. İnsan Embriyonik Fibroblast hücre hattı üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	121
Şekil 54. Hücre kültürü Western Blot görüntüleri	122

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deneş Hayvanlarına Uygulama Protokolü	33
Tablo 2. N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri.	39
Tablo 3. EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.....	40
Tablo 4. Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği.....	41
Tablo 5. Tipik NQO1-DCPIP aktivite ölçüm karışımının içeriği	42
Tablo 6. Tipik bir katalaz aktivite ölçüm reaksiyonunun içeriği.....	43
Tablo 7. Tipik bir SOD aktivite ölçümünün içeriği	43
Tablo 8. Tipik bir glutasyon peroksidaz aktivite ölçümünün içeriği	44
Tablo 9. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.....	46
Tablo 10. Seçilen Genler için tanımlanan primer dizileri	49
Tablo 12. Denek Bilgileri.....	57
Tablo 13. Sıçan karaciğer fraksiyonlarının protein miktarları	59
Tablo 14. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H).....	61
Tablo 15. Aromataz aktivitesi (DBFOD).....	63
Tablo 16. Aminopiren N-demetilaz aktivitesi (APND)	66
Tablo 17. Benzfetamin N-demetilaz aktivitesi (BPND).....	68
Tablo 18. Eritromisin N-demetilaz (ERND)	70
Tablo 19. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi (EmND)	72
Tablo 20. Kafein N-demetilaz aktivitesi (C3ND).....	74
Tablo 21. NDMA aktivitesi	76
Tablo 22. BROD Aktivitesi	78
Tablo 23. EROD aktivitesi.....	80
Tablo 24. MROD aktivitesi	82
Tablo 25. PROD aktivitesi.....	84
Tablo 26. NQO1 aktivitesi.....	86
Tablo 27. GST- CDNB aktivitesi	88
Tablo 28. GST- DCNB aktivitesi	90
Tablo 29. GST- EA aktivitesi.....	91
Tablo 30. GST- EPNP aktivitesi.....	93

Tablo 31. Katalaz aktivitesi	95
Tablo 32. SOD aktivitesi	97
Tablo 33. GPX aktivitesi	99
Tablo 34. AST-ALT aktiviteleri	101
Tablo 36. Tüylü yakıtunun sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzim aktivitesi üzerine genel bir derleme	106
Tablo 37. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler	109
Tablo 38. mRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen değerler	117
Tablo 39. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	117
Tablo 40. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	118
Tablo 41. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	119
Tablo 42. İnsan Embriyonik Fibroblast hücre hattı üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi	120
Tablo 43. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler	123
Tablo 44. Proteom sonuçlarına göre ekspresyonları değişen proteinler	127

ÖZET

Yakıotunun Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Proteomik ve Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması

Son dönemlerde, alternatif tedavilere artan ilgi ile birlikte, bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasalların ksenobiyotik metabolizmasına etkileri ve ayrıca antioksidatif, antimitojenik ve antikanserojenik etkileri üzerine çok sayıda yoğunlaşmış çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Önerilen bu çalışmada fitokimyasal bileşenleri bilinen ve ülkemizde geleneksel tedavide kullanılan ve etki mekanizması üzerine yeteri kadar bilgi bulunmayan tüylü yakıotunun (*Epilobium hirsutum*, hairy willow) ksenobiyotik metabolizması üzerine etkilerinin ve ilaç-diyet etkileşim potansiyelinin proteomik ve moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, elde edilen bitki ekstresi sıçan gruplarına enjekte edildi ve sıçan karaciğer, Faz I [Sitokrom P450 izoformları (CYPs)] ve Faz II (GST, NQO1 gibi) enzim aktiviteleri tayin edildi.

Çalışılan tüylü yakıotu ekstresinin etkilerinin moleküler düzeyde tanımlanması için bu enzimlerin gen ve protein ifade düzeyleri saptandı. Tüylü yakıotu ekstresi verilen sıçanların karaciğer homojenatlarında proteomik teknolojisini İki Boyutlu Jel Elektroforezi ve Kütle Spektroskopisi (2D-GE ve nLC-MS/MS)-ile indüklenen ve baskılanan proteinler kantitatif olarak tanımlandı.

Elde edilen tüylü yakıotu ekstresinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak ve var ise normal ve kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksikite farklarını belirlemek amacıyla hem kanser olmayan hücre dizileri hem de kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki araştırıldı ve hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan tüylü yakıotunun bu sitotoksik etkisini hangi mekanizmayı kullanarak gerçekleştirdiği sorusuna cevap aramak için PTEN, p53, p21 gibi tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarına etkisi Western blot analizi ile araştırıldı.

Ayrıca GP_x, SOD gibi antioksidan enzimler, serum aspartat ve alanin aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz aktiviteleri ölçümleri ile tüylü yakıotunun antioksidatif, oksidatif ve olası toksik etkileri saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışmada tüylü yakıotunun etkili bir kanser koruyucu kapasitesinin olduğu, kanser riskine karşı koruyucu olduğu ve kanserli hastalar için

alternatif tedavi etmeni olabileceği gösterilmiştir. Bunun yanısıra, özellikle yüksek dozlarda nöromasküler hastalıkları tetikleme potansiyelinden dolayı bireysel doz saptamasının mutlak gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sitokrom P450, Ksenobiyotik Metabolizması, Tüylü Yakıtı, Proteom, mRNA ve Protein Ekspresyonu

ABSTRACT

Comprehensive Identification of the Effects of Hairy Willow on Xenobiotic Metabolism and its Drug-Diet Interaction Potentials using Proteomics and Molecular Approaches

Recently, with increasing popularity towards traditional medicine such as herbal remedies or dietary supplements there has been numerous studies concentrating on the actions of phytochemicals, either dietary or nondietary herbals preparations, on xenobiotic metabolism and their antioxidant, antitumour, anticarcinogenic and antimutagenic effects. The purpose of this proposed project is to elucidate the underlying mechanism defining the effects of hairy willow herb (*Epilobium hirsutum*) whose phytochemical contents are known and used as alternative medicine on xenobiotic metabolism and its drug-diet interaction potentials using proteomics and molecular approaches. For this purpose, extracts were injected to rats divided into various groups and then their hepatic Phase I (Cytochrome P450 isoforms) and Phase II (such as GST, NQO1) activities were determined.

In order to determine the molecular mechanism of actions of hairy willow herb extract, gene and protein expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes given above were determined. Proteomics technology, namely 2D-Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry (2DE and nLC-MS/MS), was used to identify quantitative changes in specific proteins induced or suppressed in treated rat livers following injections of hairy willow herb extract.

Cytotoxic effects of hairy willow herb extract on non cancer cell lines and cancer cells lines were compared and tumor suppressor genes such as PTEN, p53 and p21 were studied in those cell lines with western blotting to clarify the underlying mechanism of cytotoxic actions observed with hairy willow herb extract.

In addition, effects of hairy willow herb extract on antioxidant enzymes (such as GPx, SOD) and aspartate and alanine aminotransferases and lactate dehydrogenase were determined to study the oxidant, antioxidant and possible toxic properties..

In conclusion, the results obtained in this study have shown that hairy willow might be used as an alternative medicinal plant as a protective and supportive agent against various diseases including cancer. However, since its certain doses may cause

neuromuscular diseases; therefore, personalized appropriate amount must be determined.

Keywords: Cytochrome P450, Xenobiotic Metabolism, Hairy Willow, Proteomics, mRNA and Protein Expression

1. GİRİŞ

Son yıllarda doğal olarak oluşan bitkisel kökenli kimyasallara (fitokimyasallar) gösterilen artan ilgi, bu kimyasalların kanser, yaşlanma ve kardiovasküler hastalıklar gibi patofizyolojik oluşumlarda önemli koruyucu rollere sahip olmalarının yapılan bilimsel çalışmalar ile gösterilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bitkilerin insan sağlığı üzerine olan etkileri şüphesiz asırlardır bilinmektedir (Hipokrat İ.Ö. 5. yy'da 'Diyet Üzerine' tezinde hastalığın tedavisinde diyetin önemini tanımlamıştır) ve son birkaç yüz yılda alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların şifalı bitkilere olan ilgisi de, kuşkusuz diyetel gıdalar veya tıbbi bitkilerle alınan fitokimyasallar hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Avrupa ve Amerika'da birçok yerde bu fitokimyasallar ana kaynaklarından saflaştırılmış preparatlar halinde veya diyetel katkı olarak pazarlanmaktadır. Bu hazır bitkisel preparatların tüketimi Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa'da (örneğin İngiltere'de yaklaşık her dört erişkinden biri) çok hızlı bir artış göstermekte ve satışlar milyarlarca Euro'yu bulmaktadır (Blumenthal 1999; Gruenwald 2000; Thomas ve ark. 2001).

Son on yıl süresince, bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasallar yüksek dozlarda ve sürekli alındıklarında; ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak ksenobiyotik metabolizmasını değiştirdiği, antioksidatif, antimutajenik ve antikanserojenik etkiler gösterdiğini bildiren kanıtlar sunulmuştur (Bkz. derlemeler, Zhou ve ark. 2003, 2004). Ginkgo, Echinacea, sarımsak, zencefil, meyanökü ve binbirdelik otu gibi bitkilerden elde edilen ekstre veya droglar depresyondan yüksek tansiyona kadar değişen birçok durumda tedavi etmek için ya da genel olarak iyileşmeyi sağlamak için gittikçe artarak kullanılmaktadır (Wills ve ark. 2000). Benzer olarak kardiovasküler hastalıklara ve kansere karşı koruyucu, bağışıklık sistemini güçlendirici etkiye sahip olduğuna inanılan bitki preparatlarının kullanımı da artmaktadır. Ancak, bitkisel preparatlar eş zamanlı olarak bir veya birden fazla tıbbi ilaç alan hastalar tarafından da alınmakta ve aralarında hayati tehlike arz eden beklenmedik etkileşimler oluşabilmektedir (Crone ve Wise 1997; Liu ve ark. 2000; Fugh-Berman ve Ernst 2001). Bu nedenle, bu ve

benzeri preparatların ilaçlar dâhil ksenobiyotik metabolizması ile olan etkileşimlerinin bilimsel çalışmalar ile araştırılıp ortaya konması son derece önem arz etmektedir.

1.1. Sitokrom P450 (CYP450) ve Fitokimyasal Etkileşimleri

Hem endojen (yağ asitleri, steroidler, Vitamin D vb) hem de ekzojen (ilaçlar, çevresel kirleticiler vb) bileşiklerin metabolizmasında rol alan sitokrom P450 (CYP450) enzimleri, sitokrom P450-bağımlı monooksijenazların [E.C.1.14.14.1] terminal enzimleridir ve Faz I enzimlerinin önemli bir ailesini teşkil ederler (Cooper ve ark. 1965; Adali ve ark. 1996; Arınç ve ark. 1991, 2000, 2007; Şen ve Arınç 2000; Şen ve ark. 2001; Orellana ve ark. 2001; Yamaori ve ark. 2004; James ve ark. 2005; Semiz ve Şen, 2007, Şen ve Semiz 2007; Ozkarsli ve ark. 2008). Enzime P450 adı indirgenmiş formunun karbon monoksit ile oluşturduğu kompleksin 450 nm'de maksimum absorpsiyon göstermesi nedeniyle verilmiştir. Günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık %75'inin ve çok büyük miktarda diyetel kaynaklı bileşiklerin Faz I bağımlı metabolizmalarını Sitokrom P450 enzimleri gerçekleştirir.

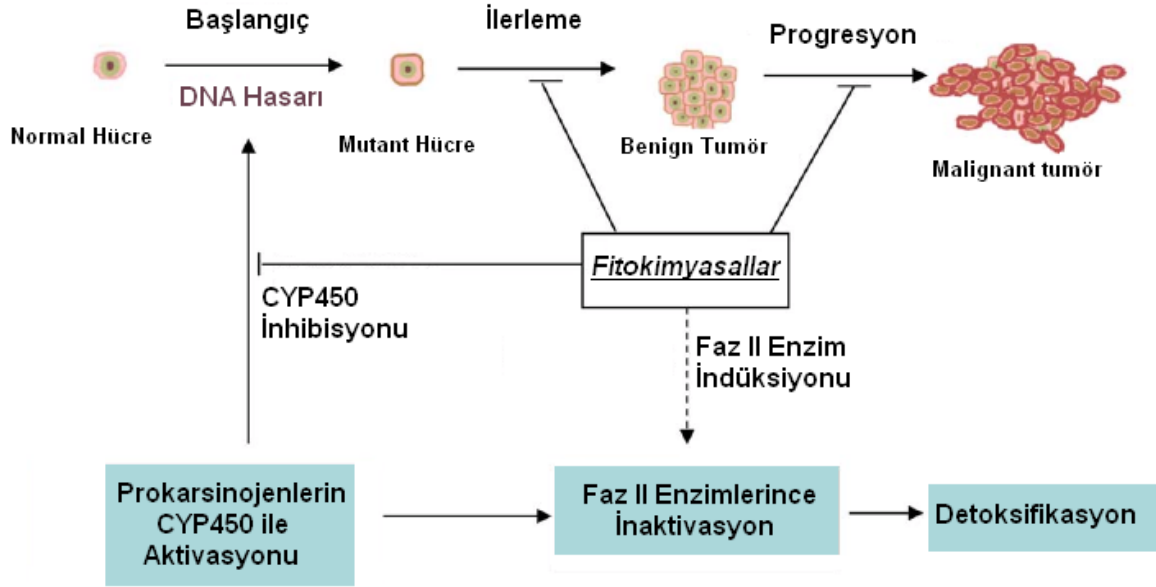
Bu enzimler böbrek, akciğer, deri, bağırsak, adrenal korteks, plasenta gibi farklı dokularda bulunur, ancak özellikle karaciğerde çok etkindir. Prokaryotik enzim çözünür bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda iç mitokondriyal membranda ve endoplazmik retikulumda yerleşmiştir. Memeli sitokrom P450'leri; ilaçlar, karsinojenler, boyalar, organik çözücüler, pestisitler, alkoller, çevresel kirleticiler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında; steroid hormonların biyosentezinde; doymamış yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonunda ve yağda çözünen vitaminlerin metabolizmasında önemli rol oynarlar (Lu ve Levin 1974; Arınç ve Philpot 1976; Nebert ve Gonzales 1987; Okita ve Masters 1997; Hasler ve ark. 1999; Orellana ve ark. 2001; Oleksiak ve ark. 2002; Nebbia ve ark. 2003). 29 Şubat 2008 itibari ile toplam 8218 sitokrom P450 izozimi (2872 hayvan, 2867 bitki, 912 bakteri, 1238 fungus ve 239 diğer ökaryotlar) tanımlanmıştır (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Bilhassa endoplazmik retikulumda bulunan P450 izozimlerinin substrat özgüllüğünün çok geniş olduğu, binlerce bileşiği metabolize ettiği gösterilmiştir (Nebert ve Gonzales 1987; Buhler ve Wang-Buhler 1998). Sitokrom P450'lerin çok fazla izoziminin bulunması ve birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz

kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir (Nebert ve ark. 1987). Bu sistemde her bir sitokrom P450 için belirli aileyi tanımlamak için rakamlar verilir. Bunu, alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler ve bir diğer rakam özgün P450 formunu göstermek için kullanılır. Örnek olarak 1A2 ve 2E1 verilebilir. CYP terimi ise sitokromun “cytochrome” ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder (Nebert ve ark. 1991; Nelson ve ark. 1996; Nelson 2003).

İnsanda bulunan 59 CYP450 izozimleri üç genel gruba ayrıştırılabilir. 1) Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3), 2) Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5-51) ve 3) Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi. Bunlardan ilk grup (bu proje önerisinin çalışma alanına giren gruptur) günümüzde kullanılan ilaçların Faz I bağımlı metabolizmalarının yaklaşık %70-80'nini gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerini içerir (Evans ve Relling 1999). Diyet, tür, genetik, yaş, fizyopatolojik şartlar ve çeşitli ajanlar sitokrom P450 enzimlerin aktivite ve ekspresyon düzeylerini etkilerler. Dokulardaki bazı sitokrom P450'lerin seviyeleri ve aktiviteleri organizmanın çeşitli kimyasallara maruz kalması neticesinde artma veya azalma gösterebilir. Dolayısı ile bu enzimlerin çeşitli bitkisel bileşiklerce düzenlenmesi, farmakolojik ve toksikolojik etkiye sahip birçok ksenobiyotiğin metabolizmasını etkileyerek çok önemli sonuçlar oluşturabilir.

Birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidlerin) özgün sitokrom P450 izozimlerini indükledikleri, aktivitelerini artırdıkları veya ketledikleri ve böylelikle ikincil uyarılara olan cevaplarını değiştirdiği bilinmektedir. Birçok karsinojenin DNA gibi makromoleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri CYP450 (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir (McLemore ve ark. 1990; Smith ve ark. 1996; Conney 2003). Oluşan reaktif metabolitler diğer Faz I veya Faz II enzimlerince inaktif ürünlere dönüştürülmektedir. Sonuç olarak, karsinojenlerin bu şekilde detoksifikasyonunda rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ve/veya diğer Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyonu, karsinojenlerin etkilerine karşı bir koruma ve savunma sistemi oluşturabilir (Şekil 1). Ancak, oldukça çok sayıda karsinojenik kimyasal yine çok sayıda CYP enzimlerince hem aktif hem de inaktif metabolitlere metabolize edildiği için istenilen antikarsinojenik etkinin oluşumu, indükleyici ajanın hangi

CYP450 izozimini ve hangi metabolik yolağı etkilediğine ve dolayısı ile indükleyici ajanın tanımlanmasına bağlıdır. Sonuçta, fitokimyasallar karsinojenlerin ve ilaçların etkinliğini, farmakolojik etkilerini ya azaltarak ya da abartarak etkileme potansiyeline sahiptir ancak istenilen etkinin sağlanması fitokimyasalın yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin tanımlanmasına bağlıdır.



Şekil 1. Çok evreli bir süreç olan karsinojenizin fitokimyasallarca bloke edilmesi veya baskılanması (Chen ve Kong, 2004'ten adapte edilmiştir).

Sitokrom P4501 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 izoformlarının kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokarsinojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Akciğer kanseri (McLemore ve ark. 1990), kolorektal kanser (Sivaraman ve ark. 1994) ve meme kanseri (Jefcoate ve ark. 2000) gibi karsinojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan birçok çalışmada diyetel veya diyetel olmayan bazı bitkilerden izole edilen bileşiklerin [(diyetel: galangin, theaflavin, quercetin, genistein vb) (diyetel olmayan: dimetoksiflavon, ksantohumol, diosmetin, hidroksichalcone, biochanin, dracaena cinnabari flavon vb)] CYP1 izoformlarının ekspresyonlarını veya aktivitelerini inhibe etmeleri ile çeşitli kanser türlerinde önemli baskılayıcı etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Ciolino ve ark. 1998; Ciolino ve Yeh 1999; Henderson ve ark. 2000; Machala ve ark. 2001; Chan ve ark. 2002; Wang ve ark. 2005; Wen ve ark. 2005). CYP2E1 etanol ile indüklenebilen,

küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilamin ve nitrozaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. CYP1 izoformlarının aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak ta kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. CYP1 ailesinde olduğu gibi çeşitli fitokimyasalların CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek veya protein düzeyini azaltarak nitrozoaminlerin karsinojenik ve mutajenik etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir (Apostolides ve ark. 1997; Shukla ve Taneja 2002; Catteral ve ark. 2003). CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer alması nedeni ile de hayli önem arz eden bir diğer CYP izoformudur. Çeşitli bitkilerin metanolik veya etanolik ekstresinin CYP3A4 aktivitesini modüle ettikleri ve bu bitki bileşenlerinin enzimle etkileştiği gösterilmiştir (Obach 2000; Bray ve ark. 2002; Zhou ve ark. 2003). Dolayısı ile fitokimyasalların CYP3A4 tarafından metabolize edilen terapötik ajanların etkinliğini azaltarak ya da artırarak etkileme potansiyeline sahip olması ve çok sayıda bileşiğin metabolizmasında yer almasından dolayı bu etkileşimlerin tanımlanması son derece önemlidir. Genelde aromataz olarak bilinen ve östrojen biyosentezinde ve metabolizmasında hayati role sahip olan bir diğer CYP izoformu da CYP19'dur. Bu öneminin yanı sıra, artan CYP19 ifadesinin meme kanseri ile ilişkilendirilmiş olması nedeni ile de dikkat çekmiş ve üzerinde fazla araştırılma yapılmış CYP izoformlarından birisidir (Miller ve ark. 1990; Zhou ve ark. 1996). Fitokimyasallar arasında özellikle flavonoidlerin ve isoflavonların östrojen yapısına benzemeleri nedeni ile aromatazın kompetitif inhibitörleri olarak etki göstermeleri meme kanseri için kimyasal koruyucu özellik kazanmalarını sağlamıştır (Kumar ve ark. 2004).

1.2. Faz II enzimleri [Glutasyon S-Transferazlar (GST) ve Kinon Redüktazlar (NQO1)] ve Fitokimyasal Etkileşimleri

Fitokimyasallar, Faz I enzimleri yanı sıra ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda yer alan diğer bir grup olan Faz II enzimlerini (genelde transferazlar) aktive ederek te antikarsinojenik etki göstermektedirler. Bu proje önerisinin kapsamında olan Glutasyon S-transferazlar (GST'ler) [E.C.2.5.1.18] Faz II biyotransformasyon

enzimlerinden çok fonksiyonlu ve dimerik olan bir ailedir, protein dizilerine, izoelektrik noktalarına, substrat spesifikliğine, inhibitörlere olan hassaslıklarına ve immünolojik özelliklerine dayanarak 5 sınıfta (alpha, mu, pi, theta ve zeta) toplanmışlardır. (Hayes ve Mantle 1986, Hayes ve Pulford 1995). Çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu katalize ederler. Böylece GST'ler, dışarıdan alınan toksik yabancı maddelerin veya oksidatif basamakta oluşan ürünlerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre bileşkenlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar (Mosialou ve ark. 1993; Bulavin ve ark. 1996). Bu anlamda GST'ler, vücut için hayati koruyuculuk fonksiyonu üstlenmiş olan enzim gruplarından biridir. Örneğin, insan gastrointestinal mukoza hücrelerinde tümör oluşumunun GST ekspresyon düzeyleri ile negatif bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Peters ve ark. 1993). Bu nedenle, GST'lerin fitokimyasallarca modülasyonu kanser için bir kimyasal koruyucu mekanizma olarak önerilmektedir (Kang ve ark. 2003).

Kinon redüktaz (QR) veya NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1 (NQO1) [E.C. 1.6.99.2] kinon ve benzeri bileşiklerden kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruyan detoksifikasyon enzimlerindendir (Ernster ve ark.1980). Kinon bileşikleri oldukça reaktif bileşikler olup çeşitli enzimler tarafından bir elektron kopararak semikinon bileşiklerin oluşmasına neden olurlar. Oluşan bu bileşikler oksidatif stres, DNA hasarı, membran hasarı gibi sitotoksositeye neden olan reaktif oksijen türevlerini oluştururlar (Estabrook 1996). Kinonlardan iki elektronun koparılması NQO1'lar tarafından gerçekleştirilir ve bu reaksiyon neticesinde semikinon bileşikler ve bağıl reaktif oksijen türevleri oluşturmadığından hücre, kinon ve kinon türevlerinin olası zararlarından korunmuş olur. Bu nedenle kanser çalışmalarında çoğunlukla çalışılan enzimlerdendir (Ernster 1967).

1.3. Fitokimyasallar

Fitokimyasallar genel anlamda bitkisel kaynaklardan elde edilmiş herhangi bir diyetel kimyasal olarak tanımlanmalarına rağmen daha spesifik anlamda normal olarak vücut fonksiyonları için gerekli olmayan ancak sağlıklı ve hastalıkları iyi edici etkiye sahip bitkisel kimyasallar olarak tanımlanmaktadırlar. Esansiyel besinlerden değildirler ve insan hayatının idame ettirilmesi için gerekli değildirler. Bu bölümde

özellikle önerilen projede ksenobiyotik metabolizması ile etkileşim gösteren fitokimyasallar ve etkileşimleri hakkında öz bilgiler verilmektedir.

1.3.1. Polifenoller

Polifenoller birden fazla fenolik grup bulunduran, taninler, ligninler ve flavonoidler gibi alt gruplara ayrılan bitkisel kaynaklı bileşiklerin bir ailesidir. *In vitro* deneyler ve hayvan çalışmaları; polifenollerin, kimyasal koruyucu, yorgunluk giderici, sinir koruyucu, antioksidan, antikanser ve hipolipidemik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Acquaviva ve ark. 2002; Pianetti ve ark. 2002; Shukla ve Taneja, 2002; Zdunczyk ve ark. 2002). Polifenoller CYP450'lerin ekspresyonunu ve/veya enzim aktivitelerini modüle ederler.

1.3.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler, fenolik ve piron halkalarından oluşan benzo- γ -piron türevleridir ve substitüye gruplarına göre sınıflandırılırlar: flavonlar, flavanollar, flavononlar, isoflavonlar, isoflavanonlar antosiyanidinler, kalkonlar, ve flavanonignazlar. Flavonoidler temel olarak antioksidan özelliklerinden ortaya çıkmış geniş alanda biyolojik aktivite sergileyen ve bazı enzim ve hücre reseptörlerini değişime uğratan bileşiklerdir. Bunlar antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar, antianjionik, analjezik, antiallerjik, karaciğer koruyucu, apoptotik, östrojenik, antiöstrojenik ve antikanserojenik özellikler içerirler (Dwyer 1995; Gordon ve ark. 1995; Nagai ve ark; 1995, Galati ve ark. 2000; Rice-Evans 2001). Bazı flavonoidlerin kimyasal yapısı ve aktiviteleri doğal olarak meydana gelmiş östrojene benzerdir ve bitkisel östrojenler olarak tanımlanırlar. Bununla birlikte bütün flavonoidler yararlı değildir. Bazı flavonoidler mutajenik veya pro-oksidan etkilere sahiptir ve aynı zamanda temel biyokimyasal yollara zarar verebilir (Gasper ve ark. 1993; Sahu ve Gray 1994).

Bazı flavonoidler CYP450'lerin substratları olarak belirlenmiştir ve çeşitli CYP450'lerin indükleyicisi olarak rapor edilmiştir (Canivenc-Lavier ve ark. 1996; Silva ve ark.1997; Ciolino ve ark. 1998; Roberts-Kirchhoff ve ark. 1999; Ciolino ve Yeh 1999; Doostdar ve ark. 2000; Rice-Evans 2001; Hodek ve ark. 2002). Galangin (3,5,7-trihidroksiflavon), kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroksiflavon), quercetine (3,5,7,3'4'-pentahidroksiflavon), genistein (5,7,4'-trihidroksiizoflavon), orobol (5,7,3',4'-tetrahidroksizoflavon), hesperetin (5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavanon)

naringenin (5,7,4'-trihidroksiflavanon) en yaygın bilinen örnekleridir. Flavonoidler tarafından indüklenme mekanizması; bir spesifik reseptör aracılığıyla gen ekspresyonunun doğrudan uyarılmasını ve/veya CYP450 protein veya mRNA stabilizasyonu içerir (Lin ve Lu 1998; Shih ve ark. 2000). Diğer bazı flavonoidler ise transkripsiyon faktörü olan Ah (Arihidrokarbon) reseptörüne bağlanarak CYP450'leri indüklerler (Kohn ve ark. 2001). Bu mekanizma CYP1 ailesi izozimlerinin (CYP1A1, 1A2 ve 1B1) aktivitelerinin yükselmesiyle ilişkilidir. Flavonoidler tarafından Ah reseptörünün kapatılmasıyla CYP1 ailesinin gen ekspresyonunun inhibisyonu flavonoidlerin kanseri önleyici özelliklerinde önemli bir rol oynar. Bir flavanol olan katekinler yeşil çayın temel polifenol bileşenleridir. Yeşil çay ve siyah çay; sıçanlarda immunoblot analizleri ile gösterildiği gibi CYP1A2'nin ekspresyonu ve metoksi-(CYP1A), etoksi-(CYP1A) ve pentoksi-(CYP2B) resorufinin O-dealkilasyonunu stimüle ederler (Bu-Abbas ve ark. 1999). Maliakal ve ark. (2001), dört hafta boyunca sıçanlara yeşil çay ekstresi verilmesinin CYP1A2 ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinde belirgin bir artış ile sonuçlandığını rapor etmiştir. Özet olarak flavonoidler; CYP450 izoformlarını, yapısal özelliklerine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak ya inhibe ya da aktive ederler.

1.3.2. Alkaloidler

Gerçekte bitkisel menşeli olan ve molekülünde tuz verebilecek en az bir azot atomu bulunan azotlu maddelere verilen grup adı olmasına rağmen fungus ve hayvanlar tarafından üretilen bileşiklere de alkaloid adı verilmiştir. Kafein, kodein ve amfetamin bilinen ünlü alkaloidlerdir. Alkaloidler, biyolojik aktif temel bileşen olarak bitkisel ilaçların birkaçında bulunurlar. *Vinca* alkaloidleri, birkaç tümörün tedavisi için kullanılan önemli kemoterapötik ajanlardır. Alkaloidler, çeşitli CYP'lerin substratları, indükleyicisi veya inhibitörleri olabilirler. Örneğin vinblastin gibi bazı *vinca* alkaloidleri CYP3A4 tarafından metabolize edilir ve tümör direnciyle bağlantılıdır (Yao ve ark. 2000). Bazı kumarin tipi alkaloidler CYP2A6'nın substratlarıdır (Pelkonen ve ark. 2000). *Evodia rutaecarpa*'dan izole edilen bazı alkaloidlerin (rutaekarpin, evodiamin ve dehidroevodiamin) fare karaciğer mikrozomlarında 7-metoksiresorufin O-demetilaz ve 7-etoksiresorufin O-deetilaz (CYP1A ve CYP2A) aktivitelerini inhibe ederken benzfetamin (CYP2B), N-nitrosodimetilamin (CYP2E1), nifedipin (CYP3A) ve

eritromisine (CYP3A) karşı hepatik oksidasyon aktivitelerini değiştirmemiştir (Ueng ve ark. 2002).

1.3.3. Terpenoidler

Aynı zamanda isoprenoidler olarak ta adlandırılan terpenoidler beş karbonlu bir bileşik olan izoprenin çok değişik şekilde bir araya gelmesi ve modifiye edilmesiyle oluşmuş çok geniş ve yaygın bir fitokimyasal grubudur. Birçoğu çok halkalıdır, birbirlerinden çoğunlukla sadece fonksiyonel yan grupları ile farklılık gösteririler ve içerdikleri izopren sayısına göre sınıflandırılırlar: Monoterpenoidler (2), Sesquiterpenoidler (3) (şekil 3), Diterpenoidler (4), Sesterterpenoidler (5), Triterpenoidler (6), Tetraterpenoidler (8) ve Politerpenoidler (ok sayıda).

Terpenoidler birçok bitkisel preparatta bulunur. *In vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmaları terpenoidlerin antikanser, iltihap tedavi edici, antiallerjik, bağışıklık sistemini güçlendirici, hipolipidemik, antihipertansiyon, antihepatotoksik, antiviral, hipoglisemik, antifungal ve antiparazitik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Lacailledubois ve Wagner 1996; Connolly ve Hill 1997). α -Hederin farelerde doz ve zaman bağımlı olarak total hepatik CYP içeriğini ve mikrozomal etoksirezorufin O-deetilaz (CYP1A1), metoksirezorufin-O-demetilaz (CYP1A), pentoksiresorufin O-dealkilaz (CYP2B) ve anilin hidrosilaz (CYP2E1)'in aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Jeong 1998).

Bu etki, enzimlerin protein konsantrasyonlarında redklenmeyle gözlenmiştir. Bu etki immunoblot analizi ile ve aynı zamanda northern blot analizi ile de gösterildiği gibi CYP1A1/2 ve CYP2B1/2'nin mRNA seviyeleri ile belirlenmiştir. α -Hederin fare hepatoma hücre hatlarında (Hepa-1c1c7) CYP1A1 geninin tepki elementi olan dioksinin indükleyici etkisini CYP1A'nın enzimatik aktivitesinde (EROD), protein ve mRNA seviyesinde baskılamıştır (Jeong ve Lee 1999).

1.3.4. Antrakinonlar

Antrasen türevi olan ve aromatik bir bileşik olan antrakinon (9,10-dioksoantrasen) eşitli bitkilerde, likenlerde ve böceklerde pigment olarak bulunur. Antrakinonlar (AQ) CYP450'ler ile substratları, indükleyicileri ve inhibitörleri olarak üç şekilde etkileşirler. Örneğin, çoğu laksatif ilaçta bulunan bir antrakinon olan emodin (3-metil-1,6,8-

bihidroksiantraquinon) CYP1A2 tarafından 2-hidroksiemodine metabolize edilir (Mueller ve ark. 1998). Hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalar çeşitli CYP'lerin (özellikle CYP1A) güçlü indükleyicisi olan bazı antrakınonları göstermiştir (Longo ve ark. 2000; Wang ve ark. 2001). Bunun yanı sıra bazı AQ'lar, çoğu prokarsinojenin aktivasyonundan sorumlu olan CYP1A1/1A2'nin güçlü inhibitörleridir (Hao ve ark. 1995; Sun ve ark. 2000; Lee ve ark. 2001). Örneğin; emodin, krizofanol ve rhein içeren birkaç AQ CYP1A1'i inhibe etmiştir (Sun ve ark. 2000). Doğal ve sentetik AQ'ların bir başka serisi, sıçan hepatik mikrozomlarında 7-etoksikumarin O-deetilaz (CYP1A2) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hao ve ark. 1995).

1.4. Projede Kapsamında Çalışılan Bitki

Türkiye florası ilginç ve zengin bir yapıya sahip oluşunu; Türkiye'nin Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan fitocoğrafik bölgelerinin karşılaştığı bir yerde bulunmasına, Güneybatı Asya ile Güney Avrupa arasında bir köprü oluşturmasına, çok sayıda cins ve türün gen merkezlerinin Anadolu olmasına, topoğrafyanın farklılıklar göstermesine, çok farklı iklim tiplerinin bulunmasına, jeolojik ve jeomorfolojik yapının çok değişkenlik göstermesine, tür endemizminin yüksek olmasına ve birçok kültür bitkisinin anavatanının Türkiye olmasına bağlamak mümkündür (Davis 1965). Türkiye'deki toplam takson sayısının ise yaklaşık 12.000 civarında olduğu tespit edilmiştir.

Bitkilerin tedavide kullanılmaları çok eski tarihlerde başlar. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de tıbbi açıdan önemli bulunan bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında kullanılmaktadır. Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmokopelerinde (kodeks) ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bundan ancak 500 kadarının tarımsal üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçla kullanılan bitkilerin çok azı farmokopelerde kayıtlıdır. Örneğin Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Halbuki Türkiye de tıbbi amaçla tüketilen bitki sayısı çok fazladır, hatta bazı yayınlarda bunun en az 500 civarında olduğu kaydedilmektedir (Baytop 1994). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların % önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu amaçla birçok bitki farmakolojik yönlerden hatta

biyolojik savaşın gündemde olduğu son yıllarda bitki savunma mekanizması bakımından da çok yönlü araştırılmaktadır. Bitkilerin insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır.

Çalışma kapsamında seçilen tür ile ait olduğu familya, bitkinin genel özellikleri, fitokimyasal içeriği, halk arasında kullanılış şekilleri ve bu bitkinin tedavi edici etkileri üzerine yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

1.4.1. Tüylü Yakıotu [*Epilobium hirsutum* L. (Onagraceae)]:

Onagraceae familyasının bir üyesi olan *Epilobium hirsutum* L., Türkiye’de yaygın olarak yetişen, kalın rizomlu, çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2). Gövde uzunluğu 30-210 cm arası değişir. Lanseolat yaprakları, yoğun tüylüdür, kenarları serrattır ve yarı-ampleksikauldur. Çiçek durumu salgi ve örtü tüyleri ile kaplıdır. Çiçekleri pembemsi-mordur. 4-10 cm boyundaki kapsülü, 1-1,5 mm çapında üzeri tüberküllü tohumları taşır. Özellikle su kenarlarında yetişir, Temmuz-Eylül aylarında çiçeklenir (Davis 1972). Türkiye’de *Epilobium* türleri genel olarak “yakıotu”, *Epilobium hirsutum* ise “tüylü yakıotu” olarak bilinir (Baytop 1994, 1999).



Şekil 2. Tüylü yakıotu (*Epilobium hirsutum*)

Bitki; polifenoller (ellajik asit, valoneik asit, protokateik asit, kafur, mirisitrin, hiperozit, guayaverin, kersetin-3-O-β-D-glukuronit, kersetin-3-O-alpha-L-arabinofuranozit), steroidler (özellikle β-sitosteroller) ve tanenler içerir (ellajitanninler) (Ivancheva ve ark. 1992; Barakat ve ark. 1997; Gruenwald 2000).

Epilobium türlerinin yaprak ve kökleri Anadolu'da genel olarak kabız tedavisinde kullanılır (Baytop 1999). Mersin, Adana illerinde yapılan bir etnobotanik çalışmada, *Epilobium*'un yakıotu adıyla, ateş düşürücü olarak ve prostatta kullanıldığı kaydedilmiştir (Tita ve ark. 2001; Everest ve Öztürk 2005). Bitki Amerikan yerlileri tarafından rektal kanamalarda, Çinliler tarafından da menstüral bozukluklarda kullanılır. Sulu ekstresi ise yara iyi edici olarak haricen uygulanır (Gruenwald 2000). Rusya'da "kaporie" çayı olarak tüketilmektedir (Grieve 1984).

Epilobium hirsutum'un toprak üstü kısımları antienflamatuvar ve ödem giderici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Sulu ekstresinin sıçan ayağındaki ödemi etkili bir biçimde engellediği gözlenmiştir. Antimikrobiyal etki de gözlenmiştir. Özellikle *Pseudomonas pyocyanea*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Sıçanlardaki tümörler üzerinde inhibe edici etki gösterdiği de rapor edilmiştir. Bitki, kötü huylu olmayan prostat hiperplazisinde ve idrar yapma sorunlarında etkilidir (Gruenwald 2000; Vitalone ve ark. 2001; 2003). Polonya'da yetişen 31 bitki üzerinde yapılan bir çalışmada, *E. hirsutum*'un yüksek oranda antioksidan etkili olduğu ve bu etkisinin içerdiği fenolik birleşiklere bağlı olduğu gösterilmiştir (Wojdylo ve ark. 2007). *Epilobium*'un toksik etkiler gösterdiği ve epileptik benzeri sendromlar oluşturduğu da ileri sürülmüştür (Chopra ve ark. 1986). *Epilobium hirsutum*'un etkileri üzerine yapılan fazla çalışma bulunmamaktadır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Tüylü Yakıotunun Toplanması

Proje kapsamındaki çalışmaların ilk bölümünü oluşturan, çalışma materyali olarak seçilen tüylü yakıotunun (*Epilobium hirsutum*) toplanması, 2009 yaz döneminde Düzce'ye yapılan arazi çalışması ile gerçekleştirildi. Daha önce, ilk proje önerisinde Kayseri-Pınarbaşı'ndan 2008 yılında toplandığı belirtilen bitki materyali, proje başlangıcının uzaması – ayrıca bu tür çalışmalarda yeni tarihli materyalin kullanılmasının avantajları - nedeniyle kullanılmadı. Onun yerine, daha yakın tarihte Düzce'den toplanan bitki materyalinin kullanılması uygun görüldü. Toplanan bitki materyali ile ilgili ayrıntılar aşağıda verilmektedir:

Bitki Materyalinin Toplandığı Tarih:	17 / 07 / 2009
Bitki Materyalinin Toplandığı Adres:	Düzce, Gölyaka, Kısa Mahmut Mahallesi'nden Saçmalıpınar Köyü'ne giderken yol kenarları.
Bitki Materyalinin Toplandığı Koordinatlar:	N 40 ⁰ 44' 19.9" E 30 ⁰ 56' 28.2"
Bitki Materyalinin Toplandığı Rakım:	563 m
Bitki Materyalinin Herbaryum (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu-AEF) Numarası:	AEF 25 812

Bitki materyali toplanırken, çevresel kirlilikten uzak bir habitatın seçilmesi gerekliliği göz önünde bulunduruldu.

Bitkiler araziden toplandıktan sonra herbaryum örnekleri, morfolojik özelliklerini çok fazla kaybetmeden herbaryum kurallarına göre preslendi. Türkiye Florası (Davis, 1978, 1984, Gençler-Özkan 2002) ve Ankara'daki üniversite herbaryumlarındaki örnekler yardımıyla teşhis edildi. Preslenerek kurutulan şahit numuneleri ile hazırlanan herbaryum örnekleri etiketlenip herbaryum numarası verildikten sonra

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na (AEF) kaldırıldı. Biyoetki ve kimyasal çalışmalar için, usulüne uygun olarak toplanan örnekler ise geniş elekler üzerinde, gölge ve havadar bir yerde kurutuldu. Kurutulmuş örnekler laboratuvar ölçeğindeki değirmende toz edildi.

2.2. Ekstrenin Hazırlanması ve Ana Etken Maddelerin Tanımlanması

2.2.1. Ekstrenin hazırlanma yöntemleri

Öğütülmüş ve toz haline getirilmiş bitki örneklerinden 50 g alınarak 8 saat süreyle oda sıcaklığında, steril distile su ile hareketli maserasyona tabi tutuldu. Bu işlem için Heidolph marka mekanik karıştırıcı cihazı 300 devir/dak. hızda kullanıldı. Elde edilen ekstre süzgeç kağıdından süzüldü ve liyofilizatörde (Christ Gamma 2-16 LSC) kurutuldu ve tartıldı. Verim hesabı (w/w) yapıldı. Ekstre, aktivite ve enjeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere sıkıca ambalajlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

Elde edilen toz ekstre, distile suda ya da ilgili tamponlarda kolayca çözülerek kullanıldı.

2.2.2. Etken Bileşiklerin Teşhisleri (Kalitatif-Niteliksel)

Her ne kadar seçilen tüylü yakıotunun fitokimyasal içerikleri bilinmesine rağmen, farklı lokalitelere göre polifenol bileşiklerinin değişkenlik göstermesi nedeni ile çalışmamızın diğer bir kısmını bu bitkinin etken bileşiklerinin kalitatif tayini oluşturmaktadır (kontrol amaçlı). Yukarıda kullanıma hazır hale getirilmiş liyofilize ekstre yada öğütülerek toz haline getirilmiş tozlarına aşağıda ayrıntısı verilen teşhis reaksiyonları ayrı ayrı uygulanmıştır.

2.2.2.1. Alkaloit teşhisi

Tüylü yakıotunun öğütülerek toz haline getirilmiş tozlarından 0,5 g alınarak % 6 H₂SO₄ içeren % 70'lik etanolün 10 ml'si ile 1 dakika kaynatılıp, soğutularak çökmeye bırakıldı. Üstteki sıvı kısımdan 2 tüpe az miktarda alındı. Mayer ve Dragendorff reaktifleri eklenerek çökelek meydana gelip gelmediği kontrol edildi. Bu kontrolden sonra etanollü ekstre küçük bir ayırma hunisine alınarak %25'lik Na₂CO₃ çözeltisinden yeteri kadar ilave edilerek alkalilendirildi. 15 ml kloroformla çalkalanarak tabakalar tamamen ayrıldıktan sonra kloroformlu faz bir ayırma hunisinde 15 ml

%10'luk asetik asit çözeltisiyle tüketildi. Asetik asitli faz 3 ayrı tüpe alınarak bunlardan biri kontrol için saklanırken, ikincisine Mayer, üçüncüsüne ise Dragendorff reaktifleri eklenerek çökelek meydana gelip gelmediği gözlemlendi (Tanker ve ark. 1986).

2.2.2.2. Kardiyoaktif heterozit teşhisi

Toz edilmiş 2 g örnek, 10 ml % 70'lik etanolle su banyosunda 2 dakika kaynatılıp süzüldü. Süzüntü iki misli suyla seyreltilip, 1 ml derişik kurşunsubasetat çözeltisi eklenerek süzüldü. Süzüntü 10 ml kloroformla ekstre edildi, kloroformlu faz 3 ayrı kapsüle alınıp aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı (Tanker ve ark. 1986):

a. Keller Kiliani Reaksiyonu: Kapsüldeki çözelti kuruluğa kadar uçuruldu. Üzerine 3 ml, % 3,5'luk glasiyal asetik asitli $FeCl_3$ çözeltisi ilave edilip 1 dakika bekletildi. Sonra deney tüpünde bulunan 2 ml kadar derişik sülfirik asit üzerine bir tabaka yapacak şekilde dikkatle aktarıldı, meydana gelen renk gözlemlendi.

b. Baljet Reaksiyonu: Kapsüldeki çözelti uçurulup, artık 1 ml etanolde çözüldükten sonra üzerine Baljet Reaktif damlatıldı, renklenmenin meydana gelip gelmediği gözlemlendi.

c. Liebermann- Burchard Reaksiyonu: Kapsüldeki çözelti uçurulup artık 1 ml glasiyal asetik asitte çözüldü. Tüpe alınan bu çözelti 1-2 damla derişik sülfirik asit ile tabakalandırılıp meydana gelen renk gözlemlendi.

2.2.2.3. Saponozit teşhisi

Toz edilmiş 0,5 g örnek 10 ml sıcak su ile beraber bir deney tüpüne konup, soğuduktan sonra yaklaşık 10 saniye kadar kuvvetle çalkalandı. Saponozit varsa en az 10 dakika sabit kalan 1–10 cm yüksekliğinde ve üzerine 1-2 damla 2N HCl damlatıldığında kaybolmayan bir köpük tabakasının meydana gelip gelmediği kontrol edildi (Çubukçu 1992).

2.2.2.4. Flavonoitlerin teşhisi

Toz edilmiş bitki % 2'lik dekoksasyon hazırlandı, süzüldü ve soğutuldu. Bu ekstre üçe ayrılıp aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı:

•Birkaç damla % 10'luk amonyak çözeltisi ilave edilerek meydana gelen renk gözlemlendi.

- Bazik kurşun asetat ilavesiyle oluşan renk gözlemlendi.
- Sulu $FeCl_3$ çözeltisinden damla damla ilave edilerek oluşan renk gözlemlendi.

•Siyanidin Reaksiyonu: Toz edilmiş bitki örnekleri 5 ml etanolle iyice çalkalanarak ve hafif ısıtılarak ekstre edildi. Ekstre süzöldükten sonra, süzöntü üzerine 0,5 ml derişik HCl ve bir spatöl ucu ile Mg tozu ilave edildi. Hidrojen çıkışı ile köpökte oluşan renkler gözlemlendi (Tanker ve ark. 1986).

2.2.2.5. Antosiyanozit teşhisi

Toz edilmiş bitki örnekleri % 50'lik etanolle hafif alevde ekstre edilip süzöldü, süzöntü beşe ayrıldı ve aşğıdaki reaksiyonlar uygulandı:

- Seyreltik H_2SO_4 ilavesiyle oluşan renk gözlemlendi.
- Önce NaOH çözeltisi ilave edilip sonra HCl ile asitlendirilir ve meydana gelen renkler gözlemlendi.
- % 10'luk kurşun asetat çözeltisi ile meydana gelen çökelek gözlemlendi.
- Bir miktar amil alkol konup çalkalanır ve tabakalarda meydana gelen renklenme gözlemlendi.
- Seyreltik H_2SO_4 ile hafifçe ısıtıldı, soğutulduktan sonra amil alkolle çalkalandı, amil alkol tabakasında meydana gelen renklenme gözlemlendi (Tanker ve ark. 1986).

2.2.2.6. Siyanogenetik heterozit teşhisi

Toz edilmiş bitkinin 1g'ı 100 ml'lik bir erlene konularak, ancak ıslatacak kadar su ilave edildi. Sodyum karbonat çözeltisi ile ıslatılan pikrik asit emdirilmiş bir süzgeç kağıdı, su ile ıslatılmış drogun yakınına kadar erlenin içine sarkıtılarak bir mantar tıpa yardımıyla hafifçe sıkıştırıldı. Erlen hafif bek alevinde ısıtılıp kağıtta meydana gelen renk gözlemlendi (Tanker ve ark. 1986).

2.2.2.7. Tanen teşhisi

Bitki örneklerinin toz edilmiş halinden %5'lik infüzyon hazırlanır. Bu infüzyon üzerinde aşğıdaki incelemeler yapıldı:

- Ağır metal tuzları ile verdiği çökelek gözlemlendi.
- %5'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile verdiği renk gözlemlendi.

- %1'lik tuzlu jelatin çözeltisi ile verdiği çökelek gözlemlendi.
- Bromlu su ilave edilerek oluşan çökelek gözlemlendi.
- Stiasny reaktifi (formol+derişik HCl) ile meydana gelen çökelek gözlemlendi (Çubukçu 1992).

2.2.2.8. Antrasen teşhisi

Toz edilmiş 0,1 g örnek alınarak, 5 ml seyreltik H₂SO₄ ile 2 dakika kaynatıldı. Hidroliz ürünü sıcakken süzöldü. Süzöntü soğutuldu ve az miktar benzenle ekstre edildi. Üstte bulunan benzen tabakası alındı ve % 10'luk amonyak ile çalkalandı. Altteki amonyak tabakasının rengi gözlemlendi (Tanker ve ark. 1986).

2.2.2.9. Kumarin teşhisi

Toz edilmiş 1 g örnek alındı, bunun üzerine 10 ml 1N H₂SO₄ ilave edildi. Geri çeviren soğutucu altında 10 dakika kaynatıldı ve sıcakken süzöldü. Süzöntü ayırma hunisinde 15 ml kloroformla çalkalandı. Kloroformlu faz ayrılıp bunun 5 ml'si üzerine 5 ml %10'luk NH₃ çözeltisi ilave edilerek çalkalandı. Çözelti 5 dakika bekletildikten sonra amonyaklı fazın UV366 nm'de floresans verip vermediğı kontrol edildi (Tanker ve ark. 1983).

2.2.2.10. Uçucu yağ teşhisi

Bitki örnekleri parmaklar arasında ovuşturulması ile bir koku oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Yine aynı örneklerin tozundan hazırlanan preparatlar Sartur reaktifi ile incelendi: Preparata hafif ısı uygulandı. Ayrıca seyreltik etanol lamelin kenarından sızdırılarak preparatın yıkanması ile yağ damlacıklarının yok olup olmadığı incelendi (Tanker ve ark. 1983).

2.2.3. Tüylü Yakıotunun Standardize Edilmesi

Epilobium hirsutum sulu ekstresi Agilent teknolojileri 6210 TOF LC/MS kullanılarak rutin içeriğı açısından standardize edilmiştir. Bu amaçla, başlangıç olarak rutin LC-MS analizi gerçekleştirildi ve 611,5 kütle biriminde pik tespit edildi. 20-200 ppm aralığında değışen rutin konsantrasyonları kullanılarak ve pik alanları ile ilişkilendirilerek bir kalibrasyon grafiğı oluşturuldu. Bu grafik elde edilen ekstraktların içindeki rutin miktarını saptamak ve standardize etmek için kullanıldı.

2.2.3.1 Tüylü Yakıotu Ekstresinin FTIR Analizi

Epilobium hirsutum sulu ekstresinin Kızılötesi spektrumu Perkin Elmer 100 Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnce toz haline getirilmiş yaklaşık 1 mg *Epilobium* özütü yaklaşık 100 mg KBr ile karıştırıldı. Karışım, daha sonra preslenerek şeffaf bir disk elde edildi. Disk sonra spektroskopik inceleme için cihaz ışınına maruz bırakıldı ve elde edilen IR spektrumu kaydedildi.

2.4. Ekstrenin Deneklere Uygulanması

2.4.1. Enjeksiyon Aşaması- *in vivo* Hayvan Çalışmaları

Elde edilen tüylü yakıotu ekstresi her biri en az on sıçandan (rat) oluşan gruplara intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Grup I (Kontrol): Bu grupta 15 adet sıçana hiç bir uygulama yapılmadı ancak deney süresinde diğer gruplarla aynı koşullarda tutuldu ve 10. gün giyotin kullanılarak dekapite edilerek ötenazi yapıldı (diğer ötenazi yöntemleri çalışmayı özellikle enzimleri etkileyeceği nedeni ile fiziksel yöntem seçilerek kimyasal vb ile kirletilmemiş ya da etkilenmemiş dokular elde edilmesi amaçlanmıştır).

Grup II (Tüylü yakıotu EHT): Bu grupta 30 adet sıçan kullanılmıştır. Fakat 2 adet sıçan enjeksiyona bağlı nedenlerden dolayı ölmüştür. Tüylü yakıotundan elde edilecek ekstre steril distile su ile çözülerek beş gün boyunca 37,5 mg/kg vücut ağırlığı (va) olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresi ve dozu literatürde benzer çalışmalar için uygulanan doz ve süreler göz önüne alınarak saptanmıştır. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapitasyon ile ötenazi edilmiştir. Bu işlemler üç ayrı dönemde gerçekleştirilmiştir. (Tablo 1).

Tablo 1. Deney Hayvanlarına Uygulama Protokolü

Grup	Denek (Sıçan) Sayısı		
	I.Dönem	II. Dönem	III. Dönem
Grup-I (Kontrol)	5	5	5
Grup-II (EHT)	10	10	10

Enjeksiyon işlemlerinin bölünerek gerçekleştirilmesi öncelikle ön verilerin alınması ve böylelikle hayvanların muamele işlemlerinde karşılaşılabilecek olumsuzlukları ve tespit edilen dozların akut toksisite oluşturup oluşturmadığı gibi parametrelerin tespit edilmesi ve olası bir durumda az sayıda sıçanın telef edilmesi sağlanmış oldu. Ayrıca özellikle I. dönem çalışmalarından elde edilen pozitif verilerden sonra II. dönem çalışmaları ikiye bölünerek ardışık iki hafta içerisinde gerçekleştirildi. Bu da bir defada çok sayıda hayvanın muamele edilmesi gibi ve bunun oluşturacağı sorunları ortadan kaldırdı. III. Dönem uygulamalar olası tekrarlar için örnek oluşturmak, deneklerin ve bağlı olarak analizlerin n sayısını artırmak ve olası ön muamele oluşturmaları için gerçekleştirildi.

Tüm bu işlemler Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Veteriner kontrolünde ve gözleminde gerçekleştirildi. Bu işlemler için gerekli olan Etik Kurul izinleri Pamukkale Üniversitesi ve ODTÜ. Deney Hayvanları Etik Kurullarından alınmıştır.

2.4.2. Dokuların Temini

Bu çalışmada kullanılan Wistar Albino sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden temin edildi. Dört aylık erkek sıçanlar vücut ağırlıkları ölçülerek yukarıda tanımlanan gruplara ayrıldı ve tanımlanan uygulamalar belirlenen plan dâhilinde gerçekleştirildi. Dokular (karaciğer) ve kan diseksiyon sırasında temin edildi. Dokular ilk olarak buz üstüne alındı ve önce soğuk distile su, daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırıldı. Dokular önce steril buzdolabı poşetlerine kondu ve daha sonrada alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek sıvı azotta donduruldu. Ardından PAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırıldı, kanlar ise 10.000 rpm 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek serumları elde edildi ve serumlar derin dondurucuya kaldırılarak muhafaza edildi.

2.5. Ekstrenin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Saptanması

2.5.1. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

2.5.1.1. Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi

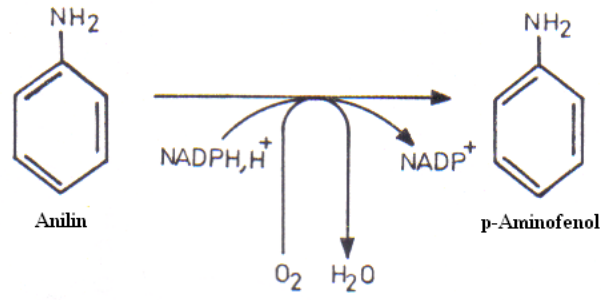
Öncelikle elde edilen dokulardan Schenkman ve Cinti (1978) metodunun laboratuvar şartlarımız için optimize edilmiş olan Şen ve Kirikbakan (2004) prosedürü ile S1.5, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlar hazırlandı. Kısaca; laboratuvar daha önceden ağırlıkları tartılan etiketli alüminyum folyolara sarılı dokular -80°C Nuair (Nuair Ultralow Freezer NU-6382E) derin dondurucudan çıkartılarak hemen buz üzerine alındı. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Makas ile dokular buz üzerinde küçük parçalara ayrıldı. Kesilen dokulara, 3 mM EDTA pH 7,8; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM PMSF; 0,3 mM ε-ACA; 0,15 mM BHT; %10 gliserol ve %0,15 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi eklenerek buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem cam-teflon homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan doku ağırlıklarınının 3 katı homojenizasyon çözeltisi eklendi. Homojenizasyon işlemi teflon tokmak cam tüp içinde 10 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Skil 6375) kullanılarak yapıldı. Elde edilen homojenat, hücresel kalıntıları uzaklaştırmak üzere Sigma 3K soğutmalı santrifüj kullanılarak 700 xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant çift katlı steril sargı bezinden süzülerek peletten ayrıştırıldıktan sonra 12,000 x g'de 25 dakika tekrar santrifüj edildi. Elde edilen fraksiyonda pelet atıldı ve süpernatant ise hacminin 0,5 katı soğuk 0,16 M CaCl₂ eklenmesi ile 32000 x g'de 25 dakika santrifüj edildi. Sıvı sitozol kısmı eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak etiketlendi ve -80°C derin dondurucuda saklandı. Kalan mikrozomal pelet, soğuk homojenizasyon çözeltisi ile yıkanarak 32000 x g de 20 dakika tekrar santrifüj edilerek yıkandı. Çıkan süpernatant dökülerek pelete başlangıç doku ağırlığınının 0,5 katı soğuk süspansiyon tamponu (2 mM EDTA pH 7,5; %10 gliserin) eklenerek elle homojenize edilip eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80°C Nuair derin dondurucuda saklandı.

2.5.1.2. Protein Tayini

Dokulardan elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albumin) standart olarak kullanılarak Lowry ve ark. (1951)'nin metoduyla yapıldı. 1:200 oranında seyreltilmiş olan mikrozomlar test tüplerine 0,1 ml'den 0,5 ml'ye değişen hacimlerde alındı ve son hacim deiyonize distile su ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Sonra %2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve %2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in karıştırılmasıyla oluşturulan alkali bakır reaktifi ile karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden her bir tüpe ilave edildi ve 50°C'de 10 dakika inkübe edildi. Oluşan rengin yoğunluğu her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplandı.

2.5.1.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Tayini (CYP2E1)

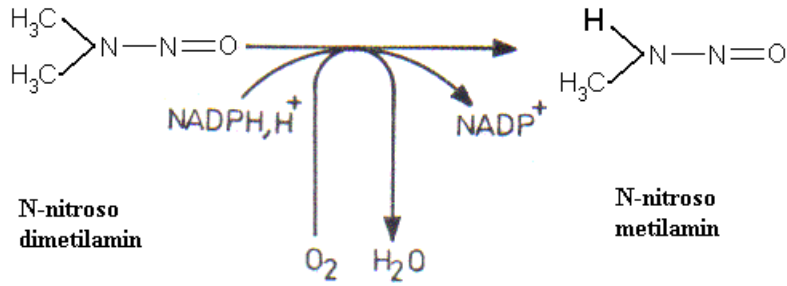
Doku mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark. (1966) tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi (Şekil 3). Tipik reaksiyon karışımı 100 mM HEPES tamponu, pH 7,6 ve 10 mM anilin, karaciğer için 1 mg mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH içerir ve son hacim 0,5 ml'e tamamlandı. Reaksiyon 0,5 mM NADPH eklenmesiyle başlatıldı ve içinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH eklemeyen önce %20 TCA eklendi. İnkübasyon 37°C'de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. Reaksiyon İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine %20 TCA eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12100 xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Sonuçta, süpernatant yeni tüplere transfer edilip %20 Na₂CO₃ eklenerek nötralize edildikten sonra 0,4 N NaOH içeren %20 fenol eklenerek renk oluşumu sağlandı. Renk oluşumu için 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 630 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü.



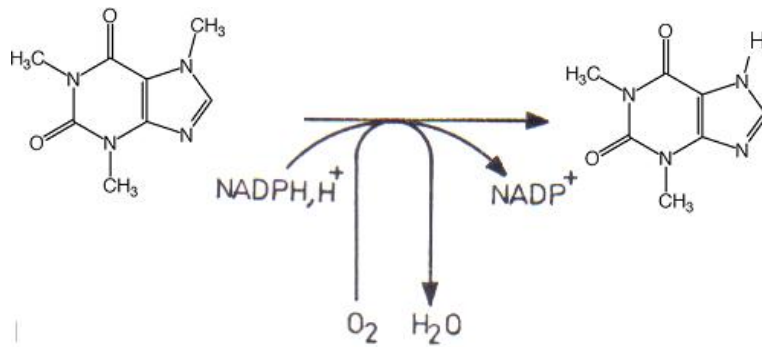
Şekil 3. Anilin 4-hidroksilasyonu

2.5.1.4. N-Demetilaz Aktivite Tayinleri

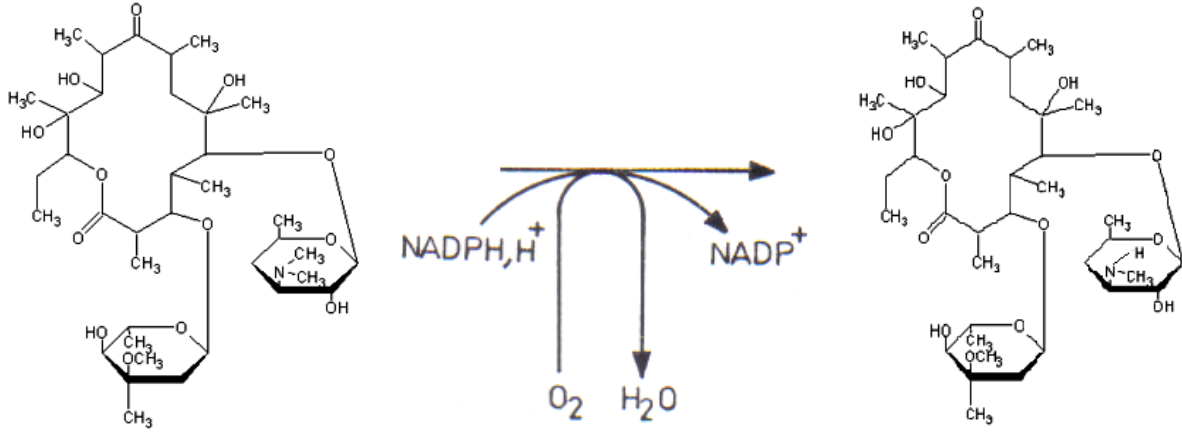
Sıçan doku mikrozomlarındaki Etilmorfin, N-Nitrosodimetilamin, Eritromisin, Kafein ve Aminopiren N-demetilaz aktiviteleri Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir (Şekil 4-8).



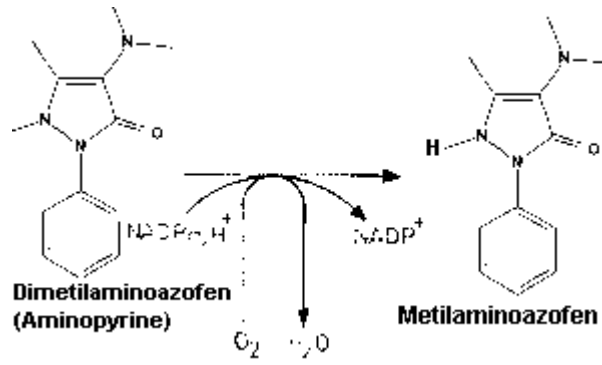
Şekil 4. N-nitrosodimetilamin N-demetilasyonu



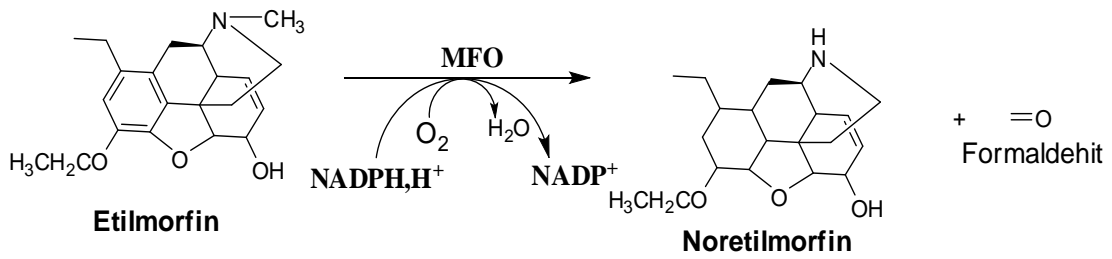
Şekil 5. Kafein N-demetilasyonu



Şekil 6. Eritromisin N-demetilasyonu



Şekil 7. Aminopiren N-demetilasyonu



Şekil 8. Etilmorfin N-demetilasyonu

Tablo 2'de her bir substrat için reaksiyon karışımında olması gereken son konsantrasyonlar verilmiştir. Buna göre tipik reaksiyon karışımı HEPES tamponu, uygun substrat, belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml olacak şekilde hazırlandı. NADPH'ın ortama

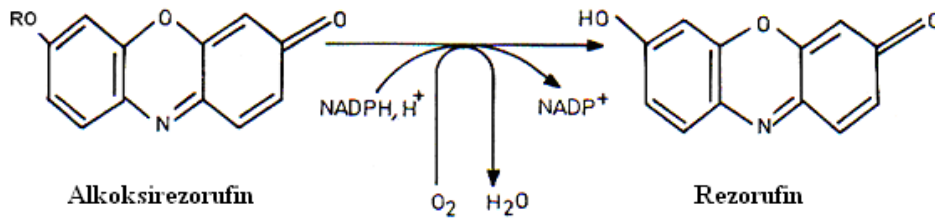
eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH eklemeyen önce 0.75 N'lik perklorik asit eklendi. İnkübasyon 37 °C'de, 25 dakika çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12100 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Sonuçta, süpernatant yeni tüplere transfer edilip Nash reaktifinden eklenerek renk oluşumu için 10 dakika 50 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı. Enzim aktiviteleri sırasıyla, Etilmorfin N-Demetilaz (EmND; CYP2B) Eritromisin N-demetilaz (ErND), N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA-ND; CYP2E1,), Kafein N-Demetilaz (CN3D; CYP1A2, CYP3A1) ve Aminopiren N-demetilaz (APND, CYP2C9, CYP3A, CYP2B) olarak isimlendirilmektedir. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar yukarıdaki şekillerde verilmiştir.

Tablo 2. N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri.

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
HEPES tamponu pH 8.0 (EmND için) pH 7.5 (APND için) pH 7.7 (NDMA-ND için) pH 7.8 (END ve CN3D için)	100 mM 100 mM 50 mM 50 mM
Substrat Etilmorfin 4-dimetilaminoantipiren N-nitrosodimetilamin Eritromisin Kafein	15 mM 0,1 mM 2,5 mM 5 mM 0,1 mM
Mikrozomal protein (karaciğer) APND ve CN3D için EmND için NDMA-ND, ErND için	2 mg/ml 1,5 mg/ml 1 mg/ml
NADPH	0,5 mM

2.5.1.5. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktiviteleri Tayini

Sıçan doku mikrozomlarının EROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) metodu ile Şekil 9'da verildiği gibi tespit edilmiştir ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanılmıştır. Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksirezorufin (CYP1A1) kullanılmıştır. Tablo 3'te substrat için reaksiyon karışımında olması gereken son konsantrasyonlar verilmiştir. Buna göre tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7,80, 100 mM NaCl, 1,2 mg BSA, 100 µg mikrozomal protein verilen konsantrasyonlarda substrat ve 0,1 M NADPH içermektedir.



Şekil 9. Alkoksirezorufin dealkilasyonu

Her bir substrat (7-etoksirezorufin, 7-metoksirezorufin, 7-pentiloksirezorufin ve 7-benziloksirezorufin) için enzim aktiviteleri sırasıyla; etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), pentiloksirezorufin O-depentilaz (PROD), metoksirezorufin O-demetilaz (MROD) ve benziloksirezorufin O-debenzilaz (BROD) olarak isimlendirilmektedir.

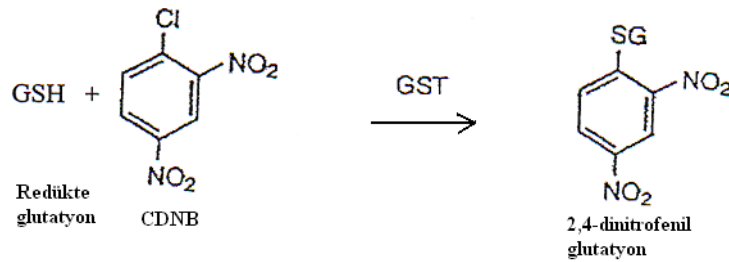
Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 3'te belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3. EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH7,8	100 mM
NaCl	100 mM
BSA	1,2 mg
Mikrozomal protein 1 mg/ml	100-200 µg
<u>Substrat</u>	
NADPH	0,50 mM

2.5.1.6. Sitozolik Glutatyon S-Transferaz Aktivite Tayini

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Şen ve Kirikbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir. Habig metodu, GST tarafından CDNB ile GSH konjügasyonu sonucu oluşan 2,4-dinitrofenil glutatyon kompleksinin ışığı 340 nm'de absorplamasına dayanmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. GST-CDNB enzimatik reaksiyonu

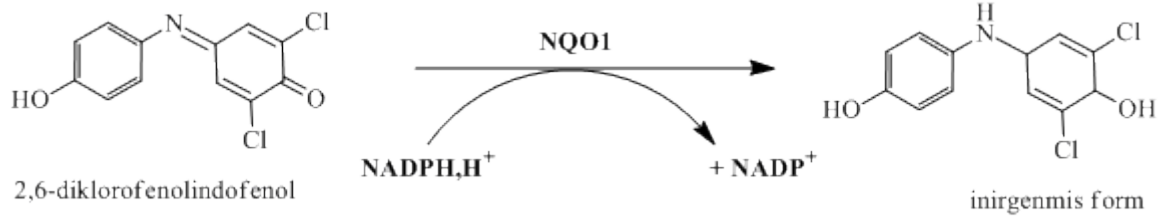
Tablo 4'deki gibi tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7,50, 1 mM redükte glutatyon (GSH), 25-50 µg sitozolik protein ve 1 mM CDNB içermektedir. Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 4'de belirtilen stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırladı. Reaksiyon en son CDNB ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn'lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Jenway Specord 200 spektrofotometrede 340 nm'de 1 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 4. Tipik GST-CDNB aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH 7,5	100 mM
Glutatyon (GSH)	1 mM
CDNB	1 mM
Sitozolik protein	50-100 µg

2.5.1.7. Sitozolik Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivite Tayini

Hazırlanan doku sitozollerinde NQO1 aktivitesi 2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP) substratı kullanılarak Ernster ve ark. (1960) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edilmiştir. Bu metot 600 nm'de ışığı absorplayan DCPIP 'nin NQO1 tarafından indirgenmesi sonucu oluşan indirgenmiş formunun azalan absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. NQO1 enzimatik reaksiyonu

Tablo 5'teki gibi tipik reaksiyon ortamı 25 mM potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7,8, 0,7 mg/ml Sığır Serum Albümini, 0,2 mM NADPH, 40 mM 2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP) ve 50–100 µg sitozolik protein içermektedir. Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 5'te belirtilen stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son NADPH ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon 10 sn'lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi spektrofotometrede 600 nm'de 2 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve 21 mM⁻¹.cm⁻¹ olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Tablo 5. Tipik NQO1-DCPIP aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok Çözeltiler	Son
KPi tamponu pH 7,8	25 mM
Sığır Serum Albümini	0,7 mg/ml
Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	0,2 mM
2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP)	40 mM
Sitozolik protein	50–100 µg

2.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

2.6.1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz enziminin aktivite ölçümü Abei (1974) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot katalaz tarafından hidrojen peroksitin oksidasyonununun 240 nm'de takibine dayanmaktadır.

Tablo 6'da verildiği üzere reaksiyon ortamı hazırlandı ve çözeltiler verilen sırada 3 ml'lik kuartz küvetlere konularak Jenway Specord 200 spektrofotometrede 240 nm'de 5 dakika takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri kullanılarak hesaplandı.

Tablo 6. Tipik bir katalaz aktivite ölçüm reaksiyonunun içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPI tamponu (pH: 7,0)	140 mM
Hidrojen peroksit	% 3
Enzim (1000 x g post fraksiyonel protein)	0,2 mg

2.6.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enziminin aktivite ölçümü Marklund ve Marklund (1974) spektrofotometrik metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot SOD tarafından pirogallolun oksidasyonununun 440 nm'de takibine dayanmaktadır.

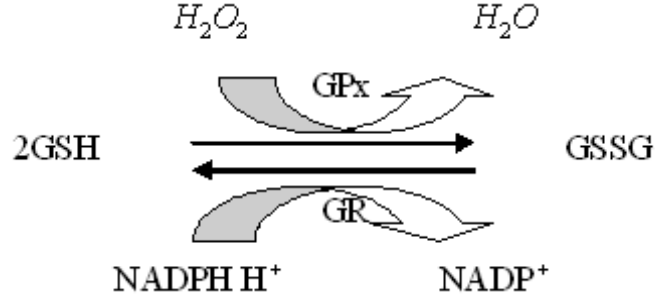
Çözeltiler Tablo 7'de verilen sıraya göre 3 ml'lik kuartz küvetlere konuldu ve Jenway Specord 200 spektrofotometrede 440 nm'de 7 dakika boyunca takip edildi. Daha sonra buradan elde edilen absorbanslara göre SOD aktivitesi hesaplandı. Her bir doku fraksiyonu için 50, 100, 200, 300, 400 µg protein ile bu işlem tekrarlandı. Protein miktarına göre aktivite değişimi dikkate alınarak hesaplamalar yapıldı.

Tablo 7. Tipik bir SOD aktivite ölçümünün içeriği

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon (mM)
Tris-HCl içinde 10 mM EDTA (pH 8,2)	140
Enzim (1000xg post fraksiyonel protein)	0,3 mg
15 mM pirogallol	1,5

2.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini

GPx enziminin aktivite ölçümü Paglia ve Valentine (1967) spektrofotometrik metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot NADPH'ın NADP⁺'ye oksidasyonunun 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. GPX enzimatik reaksiyonu

Çözeltiler Tablo 8'da verilen sıraya göre 3 ml'lik kuartz küvetlere konuldu. En son enzim koyulduktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. Daha sonrada 30 µl hidrojen peroksit reaksiyon ortamına eklenerek Jenway Specord 200 spektrofotometrede 340 nm'de 3 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 8. Tipik bir glutasyon peroksidaz aktivite ölçümünün içeriği

Stok çözelti	Son Konsantrasyon
Tris-HCl; pH 7,2	0,075 mM
GSH	1 mM
EDTA	0,1 mM
NADPH	0,05 mM
Glutasyon redüktaz	0,24 U
Enzim (sitozolik protein)	1 mg
Hidrojen peroksit	0,0075 mM

2.7. Diagnostik (Sitotoksik) Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

2.7.1. Serum Aminotransferazların (Aspartat ve Alanin)Tayini: (AST ve ALT)

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin

spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi. 0,2 ml serum 1 ml AST substratı (alkali ortamda α -ketoglutarat ve D-L-aspartik asit veya alanin) ile 37 °C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortama renk reaktifi (alkali dinitrofenilhidrazin) eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika beklendi. Son olarak reaksiyon tüplerine 0,4 N NaOH eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip oluşan renk 505 nm'de köre karşı okundu. Standard eğriden elde edilen eğimin kullanılması ile enzim aktiviteleri hesaplandı.

2.7.2. Serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Tayini

LDH ölçümü Kubowitz ve Ott (1943) tarafından tanımlanmış metodunun Wroblewski ve LaDue (1955) tarafından optimize edilmiş olan spektrofotometrik metot ile yapılır. LDH aktivite tayini piruvatın laktata indirgenmesinin spektrofotometrik olarak 340 nm de kinetik takibi ile ölçümüne dayanır. 0,1 M fosfat tamponu pH 7.5 ve 0,05 ml serum içeren ölçüm tüpüne 0,5 mM NADH eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 0,1 M Na-piruvat eklenip karıştırıldı ve spektrofotometre küvetine transfer edildi Absorbans değişimi Jenway Specord 200 spektrofotometrede 340 nm'de 3 dakika boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Serum LDH aktivitesi (ünite/ml)} = [\text{OD}_{340}/\text{dak} \times \text{TCF}^{**}] / [0,001 \times 0,05 \times l \text{ (cm)}]$$

2.8. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

2.8.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Mikrozomal proteinler Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir. Her bir CYP450 izozimi için spesifik antikolar kullanılarak Western Blot tekniği ile her bir enzimin protein düzeyleri immunolojik olarak tayin edilmiştir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde % 8,5 ayırma ve % 4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayrıştırıcı ve

sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 9’da belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

Tablo 9. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (%8,5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik ayrıştırma sistemi Thermo EC1000-90 güç kaynağına bağlanmış ve elektroforetik ayrıştırma süresince ısınmayı engellemek için sisteme 5°C’ye ayarlanmış Nüve BS302 Soğutmalı Su Banyosu bağlanmıştır. Yol gösterici boya tabana ulaştığında (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 45 dakika. süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavisi R 250, %50 metanol ve %12 glisial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı ve hem de sabitlendi. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7’lik asetik asit içeren %30’luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jel fotoğraflandı ve %7’lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan western blot analizi [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi] için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Elektroforetik transfer Panther Semidry Electrobloetter Model HEP-3 kullanılarak Yarı-kuru transfer yöntemi uygulanarak yapıldı. Panther Semidry Electrobloetter’ın platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre

kağıdı yerleştirildi ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlandı. Whatman # 1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatlice yerleştirildi. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 konarak sandviç tamamlandı. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlandı ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulandı. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirildi ve sistemin vidaları sıkıldı. Elektroforetik transfer sistemi Thermo EC1000-90 model güç kaynağına bağlandı ve voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 400 mA'e ayarlandı ve 1 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı ve sistemin vidaları açıldı. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edildi. Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel yukarıda tanımlandığı gibi boyandı. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda blot önce bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikolar ve daha sonra işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikolarla inkübe edildi. Daha sonra blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkandı. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan substrat çözeltisi (Tris-HCl, pH 8, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂, Dietanolamin, Nitroblue tetrazolyum, fenazin metasülfat ve bromokloroindoylfosfat) ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra blot havada kurutulup, stretch film ile kaplanarak karanlıkta saklandı.

2.8.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Çalışılan tüylü yakıotu bileşenlerinin enzimlerin gen ifadeleri düzeylerine etkilerini saptamak için mRNA düzeyleri qRT-PCR (Gerçek zamanlı PCR) yöntemi ile kantite edilmiştir. Bu amaçla, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptandı ve bu primerler sentezletirildi (Tablo 10'da bazı genler için kullanılan primer dizileri verilmektedir). Bu primerler kullanılarak ve qRT-PCR metodu uygulanarak önce birincil zincir cDNA Revers Transkripsiyon ile sentezlendi ve sonrada ikinci zincir cDNA oluşturuldu. Oluşturulan cDNA molekülleri

%1,5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütölüp ayrıştırıldı ve imaj analiz (DNR Probis Image Analysis System) sistemi ile kantite edildi. Ancak çalışılan ortamlarda çok miktarda RNaz olması, RNA'nın çok kolay degrade olması, yapılacak inceleme için iyi bir RNA izolasyonun önemini ve zorunluğunu ortaya koymaktadır. Bu amaçla sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklanan dokulardan "PureLink Macro-to-Midi RNA Isolation Kit"i (Invitrogen) kullanılarak iyi kalitede, degrade olmamış RNA izole edilmiştir. Bu sitem laboratuvarımızda kullanılmaktadır ve iyi sonuçlar vermektedir. Bu işlemler için üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiş ancak kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulanmıştır. Elde edilen RNA'ların 260/280 nm ölçümü ile miktarı belirlenmiştir. cDNA sentezi sırasında 4 µg RNA kullanılması sağlandı.

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. cDNA sentezi için 4 µg toplam RNA ve 0,5 µg oligo (dT) primeri karıştırıldı ve son hacmi 11 µl RNAaz içermeyen su ile tamamlandı. Karışım 70°C'de 5 dak inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ ve 50 mM DDT) ve 2 µl dNTP karışımı eklendi. 5 dak, 37°C'de inkübasyondan sonra 50 ünite Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı eklenerek son hacim 20 µl tamamlandı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 70°C'de 10 dak bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, yarı-kantitatif RT-PCR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi. Kantitatif Real Time PCR Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, PO Box 435, Concorde, NSW 2137) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon 1X Maxima® SYBR Green qPCR Master karışımı ile gerçekleştirildi. Reaksiyon tüpüne 2 µl cDNA, 9,5 µl su, 0,5 µl gen spesifik primer, 12,5 µl SYBR green qRT-PCR karışımı eklendi. İç standart gen olarak GAPDH kullanıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı (tüpü) PCR işlemi için önce 95°C'de 10 dakika denatürasyona tabi tutulur. Amplikasyon işlemi 95 °C'de 20 saniye, 54-60 °C'de 30 saniye, ve 72 °C'de 30 saniye olmak üzere toplam 45 döngüden sonra, 49°C'de 30 saniye son uzatma ile gerçekleştirilir. Bantların densitometrik analizi LightCycler (Version 3.5) yazılımı ile belirlecektir. Her band'ın

densitometrik analizi house-keeping gen olan GAPDH ile karşılaştırılarak nasıl değiştiği belirlenmiştir.

Tablo 10. Seçilen Genler için tanımlanan primer dizileri

Primer Adı*	Primer Dizisi(5'→3')
CYP19A1F	GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG
CYP19A1R	CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG
CYP1A1F	ATGCCAATGTCCAGCTCTC
CYP1A1R	GGAACTCGTTTGGATCACC
CYP1A2F	CATCCCTCAGGAGAAGATTG
CYP1A2R	TGAACTCCAGCTGATGCA
CYP2A3F	CGGGCTTTTCAAAGGCTA
CYP2A3R	CGTGGACCTTAGCCTCAATAT
CYP2B1F	TGGACAGAAGAGGTCTCCTCA
CYP2B1R	GAGCAGGTGCAGAACTGGT
CYP2D2F	GGTGGACTTTGAGAACATGC
CYP2D2R	TTGCATCTCTGCTAGGAAGG
CYP2C6F	CGGGAAGTCATACGACATTAGC
CYP2C6R	GCAGAGAGGCAAATCCATTG
CYP2E1F	GTCTGAGGCTCATGAGTTTG
CYP2E1R	TCTGGAACTCATGGCTG
CYP2J4F	CTCGTGGAAGCCATAAGAGAG
CYP2J4R	TGGGTAGAGGGCCATGTAGA
CYP3A1F	AATTCGATGTGGAGTGCCAT
CYP3A1R	CGGATAGGGCTGTATGAGATTC
CYP4A1R	AGCTCCACTAATTCGTTGTG
CYP4A1F	GAGCTTTTGTGCAGGACACT
GSTMuF	GAACGTTTCGCGGACTTACTCA
GSTMuR	ACGTATCTCTTCTCCTCATAGTTTGAATC
GSTT1F	ATGGTCCTGGAAGTGTAC
GSTT1R	AGCTACCACGTCAGCCAGG
NQO1F	TCCGCCCCCAACTTCTG
NQO1R	TCTGCGTGGGCAATACA
GAPDHF**	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
GAPDHR**	TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT
* Primer adı CYP izoformunu tanımlamakta F(forward) R(reverse)	
**Kontrol amaçlı kullanılan GAPDH primerleri.	

2.9. Ekstrenin Genotoksik Etkilerinin Saptanması

Elde edilen tüylü yakıotu ekstresinin kanser ve kanser olmayan hücre dizileri üzerindeki olası sitotoksik etkisini saptamak ve var ise bu hücreler üzerindeki sitotoksikite farklarını saptamak amacıyla teklif edilen çalışmada hem kanser olmayan hücre dizileri (ebriyonik böbrek hücre dizisi 293 ve fibroblastik hücre dizisi 3T3) hem de kanser hücreleri (eritroblastik hücre hattı K562 ve/veya akciğer kanseri hücre hatları A549, H1299, PC10, PC13) sitotoksik etki araştırılmasında kullanılmıştır. Hücrelerin kültürasyonu aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

2.9.1. Hücre Kültürü ve Tüylü Yakıotu Ekstresinin Uygulanması

Tüm hücre dizileri %10 FCS içeren RPMI1640 besi ortamı içerisinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir. Araştırma grubumuz tarafından izole edilen tüylü yakıotu ekstresi suda çözülür formda olacağı için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra değişik konsantrasyonlarda hem kanser hücre dizileri üzerine hem de kanser olmayan hücre dizileri üzerine 48 saat süresince maruz bırakılmışlardır. Tüylü yakıotu ekstresi uygulanmadan tüm hücreler 1x10⁵ /well konsantrasyonunda 96 well plakalara ekilmiş ve %10 FCS içeren RPMI1640 besi ortamında 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Bu süre sonunda tüylü yakıotu ekstresi değişik konsantrasyonlarda hücreler üzerine her konsantrasyondan 3 kontrollü olmak üzere uygulanmış ve 72 saat 37°C de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakılmışlardır.

72 saatin sonunda 96 kuyu plakadaki hücrelerden besiyeri uzaklaştırılır ve üzerine %10 etanol içinde hazırlanmış kristal viyole boyası eklenir. Süre sonunda boya hücrelerde yıkanarak uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine %50 etanol içinde 0,1 M pH 4,2 sodyum sitrat çözeltisi her kuyuda 100 µl olacak şekilde eklenir. 15 dakika çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 660 nm'de spektrofotometrede (Thermo Microplate Reader) okunur.

2.9.2. Tüylü Yakıotu ekstresinin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi:

Hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan tüylü yakıotu ekstresinin bu sitotoksik etkisini hangi mekanizmayı kullanarak gerçekleştirdiği sorusuna cevap aramak için PTEN, p53, p21 gibi tümör baskılayıcı gen ekspresyonları western blot analizi ile araştırılmıştır. Buna göre sitotoksik etkisi saptanan tüylü yakıotu ekstresi hücreler üzerine doku kültürü ortamında steril olarak eklenmiş ve değişik zaman aralıklarında (0., 2., 4., 8., 16. ve 24. saatlerde) hücrelerin besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücre protein ekstresi Ripa tamponu içerisinde toplanmıştır, örnekler 12000 xg'de 4 °C'de 1 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Toplanan örneklerden farklı eppendorf tüplere alınmış ve Biorad protein miktarı tayin kiti (Biorad Inc.) kullanılarak bu örneklerin protein miktarları saptanmıştır. Daha sonra örneklerden, belirlenen miktarlarda protein olacak şekilde alınacak bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (1/1 oranda) eklenerek 3,5 dakika su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin hemen ardından eppendorf tüp içindeki örnekler otomatik pipet kullanılarak %10'luk SDS PAJE jelle uygulanacak ve elektroforeze tabii tutulmuştur. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu içinde 4°C'de 75 mA akım şiddetinde bir gece boyunca membran üzerine transfer edilmiştir. Bu işlemden sonra membran, %5'lik yağsız süt içeren PBS çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklanmıştır. Ardından aynı membran %5 yağsız süt içinde 1:10000 (P53, p21 ve PTEN için) ve 1:50.000 (GAPDH için) oranlarında bulunan primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat işaretlenmiştir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin fare kaynaklı primer antikolarla işaretlenmesinin ardından, membran 1 saat PBST ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran fare antikolarına karşı spesifik olarak keçi üzerinde geliştirilmiş, 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (goat anti-mouse sekonder antikor) bulunduran %5 kurusütlü PBS çözeltisi içerisinde tekrar işaretlenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL çözeltisi kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatılmış ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlenmiştir.

2.10. Ekstresinin Karaciğer Tüm Doku PROTein Profillerine (PROTEOM) Etkilerinin Saptanması

Tüylü yakıotu ekstresinin sıçan karaciğerlerinde biyolojik etki süreçlerini tanımlamak ve bu etkileri düzenleyen mekanizmaları veya düzenleyici gen ürünlerini (ve genlerini) kıyaslamalı olarak tanımlamak için proteomik tekniği, 2DE-nLC-MS/MS, uygulanmıştır.

2.10.1. Tüm Doku (Karaciğer) Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması

Tüylü yakıotu ekstresinin sıçan karaciğerlerinde biyolojik etki süreçlerini tanımlamak ve bu etkileri düzenleyen mekanizmaları veya düzenleyici gen ürünlerini (ve genlerini) kıyaslamalı olarak tanımlamak için proje önerisinde proteomik tekniği, 2DE-nLC-MS/MS, uygulanması öngörülmüştür. Bu amaçla çalışmalar yapılmış ve iyi bir protein eldesi sağlanması için değişik prosedürler çalışılmıştır. Çünkü, doğru sonuç elde edilmesi için en önemli basamaklardan birincisi, örneklerden tam bir protein ekstraksiyonunun sağlanmasıdır.

2.10.2. Karaciğer Total Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması

Disekte edilen ve -80°C'de muhafza edilen karaciğer dokularından literatürdeki çeşitli yayınlardan elde edilen verilerin irdelenmesi sonucunda değişik metotlar denendi. Bu süreçte, kullanılan parçalama yöntemi (sonikasyon, vorteksleme, öğütme, rotator ile parçalama, asit çöktürme gibi), ekstraksiyon tampon ve bileşkenleri (üre, deterjan, DNase, poliampolit vb) gibi parametreler optimize edilmeye çalışıldı. Bu optimizasyon çalışmaları sonucunda, aşağıdaki yöntem geliştirildi. Bu işlemlerde kullanılacak tüm aletler (pens, ependorf vb) sıvı azotta soğutuldu. Bu amaçla, doku derin dondurucudan çıkarıldı ve önceden soğutulmuş (-80°C) havan ve tokmaklar kullanılarak dokular sıvı azot içinde iyice öğütüldü. Ependorf tüplere aseton içerisinde %10 TCA ve 20 mM DTT içeren çöktürme çözeltisi eklendi ve daraları alındı. Öğütülmüş doku soğutulmuş ve steril spatulalar yardımı ile yaklaşık 100 mg olacak şekilde tüplere eklendi ve karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 1 saat inkübe edildikten sonra 12.500 rpm'de 20 dak. santrifüj edildi.

Santrifugat atılarak elde edilen çökelek 7 M üre, 2 M tiyoüre, %2 CHAPS, %0,5 poliamfolit, 1 tablet proteaz inhibitörü, ve 2 mM DDT içeren solubilizasyon tamponunda çözüldü. Protein çözünürleştirildikten sonra Bradford yöntemi ile protein miktarı tayin edildi.

2.10.3. İlk Boyut-İzoelektrik Odaklama (IEF)

İzoelektrik odaklama için Serva firmasınca üretilen Serva IPG BlueStrips (İmmobilize pH Gradient) şeritler (pH aralığı 3-10, nonlinear, 18 cm) kullanıldı. IPG şeritleri 350 µg protein içeren solubilize edilmiş örnek çözeltisi ile rehidrasyon tepsişi üzerinde pasif rehidrasyon yöntemi ile 12-16 saat süresince ıslatıldılar. Rehidrasyon süresince evaporasyon ile tampon kaybını önlemek amacı ile şeritlerin üzeri mineral yağı ile kaplandı.

Şeritler ıslatma tepsisinden alındı, üzerindeki mineral yağından iyice uzaklaşmaları sağlanarak yeni koşma tepsisine konuldu. Striplerin + ve – uçlarının tepside aynı yönde olup olmadığına dikkat edilir. IPG şeritlerinin her iki ucuna fitiller yerleştirilerek Hoefer IEF100 cihazının odaklama tepsisine yerleştirildi ve odaklama süresince evaporasyon ile tampon kaybını önlemek amacı ile şeritlerin üzeri mineral yağı ile kaplandı ve aşağıdaki koşma programı uygulanarak odaklandı.

Program Basamağı	Voltaj (V)	Zaman (Saat)	Uygulanan (Volt.saat)
1	250	1	250
2	500	1	500
3	1500	1	1500
4	4500	9	40500
5	500	1	500
Total		13	43250

2.10.4. İkinci Boyut: SDS-PAJE

Odaklanan proteinlerin ikinci boyutta ayrıştırılabilirmeleri için SDS'e bağlanmaları ve solubilize edilmeleri gerekir ve bu nedenle IPG şeritleri ikinci boyut için ön dengelenme yapıldı. Bu işlem için şeritler 6 M üre, %30 gliserol, %2 SDS içeren 75 mM Tris/HCl, pH 8,8 jel tamponunda 10 dakika dengelendi. Dengelenen IPG şeritleri Hoefer SE600X-15-1.5 Deluxe Dual Cooled Vertical Unitesi için hazırlanan SDS-Jellerinin üzerine yerleştirildi (burada kullanılan jeller Bölüm 2.8.1 de tanımlanan sistem ile benzerdir). Yerleştirme işleminde şerit konduktan sonra eritilmiş % 1 lik agaroz eklenerek şeritin sabitlenmesi sağlandı. İşlem süresince şerit ile jel arasında hava kabarcıklarının kalmamasına özen gösterildi.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında yine bölüm 2.8.1 de tanımlandığı gibi kesintili bir tampon sisteminde 16x18 cm boyutlarında olan % 12 ayırma jelinde yapıldı. Ayrıştırma süresi yaklaşık 10 saattir.

2.10.5. Jellerin Boyanması-Proteinlerin Dedeksiyonu

Ayrıştırılan proteinlerin tespiti, hassasiyeti normal pırlanta mavisinden "Coomassie brilliant blue" daha yüksek ancak gümüş boyamasından daha az olan, fakat daha kolay ve daha tekrarlanabilir sonuçlar üreten "Colloidal Coomassie Blue G-250" boyası kullanılarak yapıldı. Kısaca, jeller distilesu içerisinde 10 dakika yıkandı ve jelin üstünü kapsayacak kadar "Colloidal Coomassie Blue G-250" ile kaplanarak 12-16 saat inkübe edildi. Daha sonra kontrast oluşuncaya kadar distile su ile yıkandı (Tüm boyama ve yıkama işlemleri çalkalayıcı içerisinde yapıldı).

2.10.6. Jellerin Analizi

Boyanan jellerin görüntüleri DNR LumiBis BioImaging System ile alındı.

2.10.7. Proteinlerin Tanımlanması

Tespit edilen spotlar (proteinler) dikkatlice jelden manuel olarak kesilerek ve doğrudan veya triptik ile muamele edilerek Proteome Factory AG şirketinden (Dorotheenstr. 94, D-10117 Berlin-ALMANYA) hizmet alımı ile nLC-MS/MS uygulaması ile tanımlanmaları yaptırılmıştır.

2.11. İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için “Tek Yönlü Anova”, “Tukey ve “Dunnet ve parametrik olmayan “Mann-Whitney U” testleri uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Yakı Otunun (*Epilobium hirsutum*) Etken Bileşiklerinin Teşhisi

3.1.1. Yakıotunun Etken Bileşiklerinin Niceliksel Teşhisleri

Yakıotunun etken bileşiklerinin kalitatif tayin sonuçları Tablo 11'de verilmektedir.

Tablo 11. Yakıotunun (*Epilobium hirsutum*) etken bileşiklerinin kalitatif tayini

Etken Madde Grupları	Uygulanan Reaksiyonu	<i>Epilobium hirsutum</i> (Herba) AEF 25 812
Kardiyoaktif Heterozitler	Keller-Kiliani Reaksiyonu	-
	Baljet Reaksiyonu	-
	Liebermann-Burchard Reaksiyonu	+
Saponozitler	Kalıcı köpük	-
Flavonoitler	% 10'luk NH ₃	++
	Bazik Pb Subasetat	++
	Sulu FeCl ₃	++
	Siyanidin Reaksiyonu	+
Antosiyanozitler	Dilüe H ₂ SO ₄	-
	NaOH-HCl	+
	Pb-Asetat	++
	Amil Alkol	+
	D. H ₂ SO ₄ - Amil alkol	+
Siyanogenetik Heterozitler	Sodyum pikratlı kağıtta tuğla kırmızısı renklenme	-
Tanenler	Ağır Metal Tuzları	+
	% 5'lik FeCl ₃	++
	% 1'lik Tuzlu Jelatin	++
	Bromlu Su	-
	Stiasny Reaktifi	-
Antrasenozitler	Amonyaklı tabakada sarı-kırmızı renk	-

Kumarinler	Amonyaklı tabaka UV ₃₆₆ nm'de kuvvetli floresans	+
Uçucu Yağlar	Koku ile tanıma	-

+ Reaksiyon verdi ++ Kuvvetli reaksiyon verdi - Reaksiyon vermedi.

3.1.2. Yakıtunun Rutin Analizleri (LC-MS Analizi) ve FTIR Spectrumu

Tüylü yakıtunun LC-MS analizinde elde edilen 611,5 kütle biriminde tespit edilen pik rutin varlığının doğrulamıştır. Ayrıca standard eğriden ekstrenin ortalama $124,6 \pm 10,9$ ppm rutin içerdiği belirlenmiştir. İlaç metabolize eden enzim çalışmaları için rutin değeri standardizasyon için kullanılmıştır. Ayrıca, *Epilobium hirsutum* ekstresinde iki adet tanımlanamayan sekonder metabolit tespit edilmiştir.

3.2. Enjeksiyon Aşaması – *in vivo* Hayvan Çalışmaları

Enjeksiyon işleminde kullanılan deneklerle ilgili bilgiler aşağıdaki Tablo 12 ve Şekil 13'te verilmiştir.

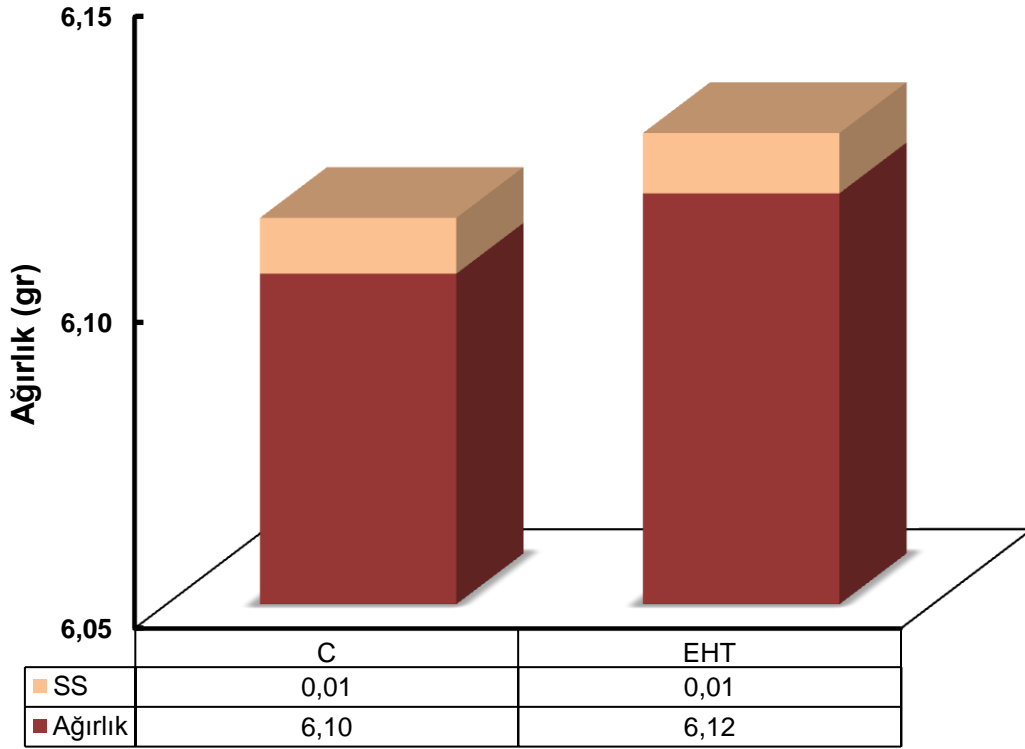
Tablo 11. Denek Bilgileri

Grup	Sıçan Sayısı	Sıçan Grupları	Vücut Ağırlığı (gr)		Doku Ağırlığı (gr)
			Deney Öncesi	Deney Sonrası	
Kontrol	15	C1	264	249	6,08
		C2	266	264	5,20
		C3	259	259	6,18
		C4	257	255	6,00
		C5	204	204	7,24
		C6	203	204	7,15
		C7	201	206	7,48
		C8	198	197	6,21
		C9	198	201	7,62
		C10	208	206	4,82
		C11	251	255	5,32
		C12	270	275	5,16
		C13	228	238	5,09
		C14	257	272	6,10
		C15	223	253	5,91

<i>Epilobium hirsutum</i> ekstresi verilen grup (EHT)	28	EHT1	276	246	6,04
		EHT2	268	242	4,75
		EHT3	215	170	3,71
		EHT4	217	201	6,22
		EHT5	210	194	6,24
		EHT6	206	194	6,62
		EHT7	232	210	7,36
		EHT8	207	186	4,58
		EHT9	223	202	4,04
		EHT10	225	196	6,31
		EHT11	216	214	5,07
		EHT12	221	222	7,00
		EHT13	231	194	5,39
		EHT14	235	207	7,07
		EHT15	220	202	6,41
		EHT16	232	207	5,34
		EHT17	223	189	5,60
		EHT18	202	204	6,61
		EHT19	203	204	5,94
		EHT20	210	204	6,29
		EHT21	206	185	6,68
		EHT22	202	195	7,53
		EHT23	200	185	6,37
		EHT24	206	186	6,93
		EHT25	274	225	6,69
		EHT26	293	252	6,91
		EHT27	287	248	6,29
		EHT28	266	227	7,29

Her bir değer, her biri en az triplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

Doku Ağırlığı



Şekil 133. Denek bilgileri

3.3. Fraksiyonların Protein Değerleri

Post mitokondriyel, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı. Kontrol ve *Epilobium hirsutum* (EHT) enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerinden hazırlanan S1.5, sitozol ve mikrozom fraksiyonlarının protein miktarları Tablo 13'te verilmektedir.

Tablo 12. Sıçan karaciğer fraksiyonlarının protein miktarları

Sıçan Kodu	Protein Miktarı (mg/ml)		
	S1.5	Sitozol	Mikrozom
C1	49,83	37,53	25,12
C2	50,74	38,42	25,20
C3	53,33	41,63	25,88

C4	70,80	34,13	15,78
C5	70,87	43,86	24,80
C6	66,07	44,38	21,33
C7	70,87	43,86	24,80
C8	66,07	44,38	21,33
C9	18,14	40,36	28,62
C10	19,06	34,83	29,75
C11	15,11	38,79	26,38
C12	13,60	40,90	30,55
C13	17,40	39,90	28,50
C14	49,83	37,53	25,12
C15	50,74	38,42	25,20
EHT1	46,52	29,70	14,84
EHT2	58,78	38,61	20,77
EHT3	55,78	36,64	16,73
EHT4	42,11	33,68	17,06
EHT5	45,91	35,83	21,45
EHT6	37,39	26,30	17,13
EHT7	49,50	29,78	21,72
EHT8	43,20	27,52	26,79
EHT9	43,46	29,81	21,27
EHT10	50,33	28,13	21,64
EHT11	41,22	26,81	20,33
EHT12	42,04	28,37	23,48
EHT13	52,44	22,08	22,58
EHT14	46,46	31,80	24,23
EHT15	45,00	27,76	19,94
EHT16	38,48	28,27	18,04
EHT17	40,94	27,41	15,59
EHT18	48,15	35,30	15,16
EHT19	40,50	34,41	22,98
EHT20	40,24	35,79	19,96
EHT21	38,19	30,36	18,77

EHT22	38,20	32,22	20,66
EHT23	44,07	31,02	15,88
EHT24	51,86	38,63	16,76
EHT25	52,67	33,40	16,73
EHT26	55,38	40,76	19,46
EHT27	38,19	30,36	18,77
EHT28	38,20	32,22	20,66

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

3.4. Yakıtunun (*Epilobium hirsutum*, EHT) Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

Her bir enzim için kontrol ve *Epilobium hirsutum* enjekte edilmiş (EHT) sıçan karaciğer enzim aktivite sonuçları aşağıda tek tek verilmektedir.

3.4.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesi (A4H)

Sitokrom P450E1 sıçan doku mikrozomlarında anilin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark. (1966) tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

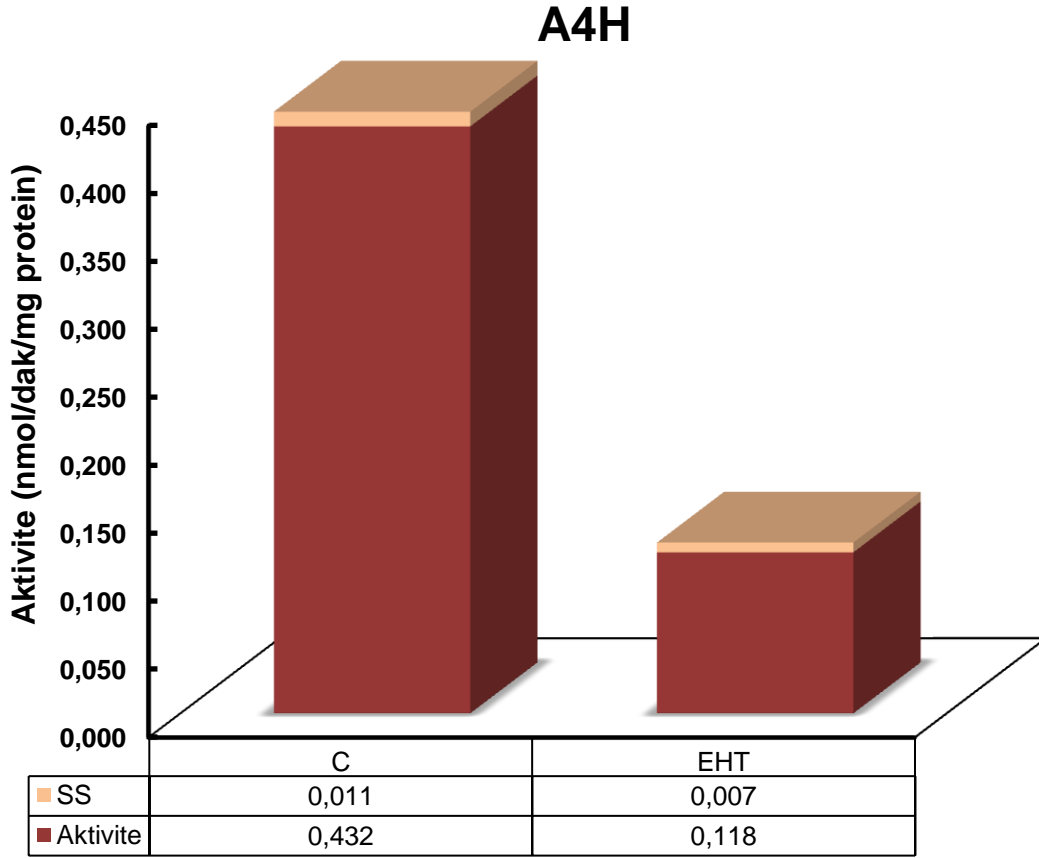
Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 14 ve Şekil 14'te gösterilmektedir.

Tablo 13. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H)

Sıçan Kodu	Enzim aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,342	0,019
C2	0,471	0,006
C3	0,633	0,028
C4	0,400	0,000
C5	0,927	0,003
C6	0,449	0,006

C7	0,345	0,003
C8	0,432	0,000
C9	0,311	0,000
C10	0,238	0,005
C11	0,436	0,006
C12	0,389	0,014
C13	0,324	0,019
C14	0,345	0,012
C15	0,431	0,040
EHT1	0,013	0,006
EHT2	0,167	0,003
EHT3	0,062	0,000
EHT4	0,218	0,006
EHT5	0,087	0,003
EHT6	0,160	0,038
EHT7	0,089	0,000
EHT8	0,071	0,000
EHT9	0,116	0,006
EHT10	0,129	0,031
EHT11	0,087	0,009
EHT12	0,091	0,003
EHT13	0,087	0,003
EHT14	0,144	0,009
EHT15	0,251	0,009
EHT16	0,064	0,016
EHT17	0,182	0,006
EHT18	0,049	0,006
EHT19	0,051	0,009
EHT20	0,078	0,003
EHT21	0,096	0,003
EHT22	0,160	0,003
EHT23	0,196	0,008
EHT24	0,173	0,006
EHT25	0,169	0,000
EHT26	0,093	0,003
EHT27	0,121	0,002
EHT28	0,110	0,005

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 14. Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H)

3.4.2. Aromataz Aktivitesi (DBFOD)

CYP19 sıçan doku mikrozomlarında dibenzilfloresein O-debenzilaz substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 15 ve Şekil 15'te gösterilmektedir.

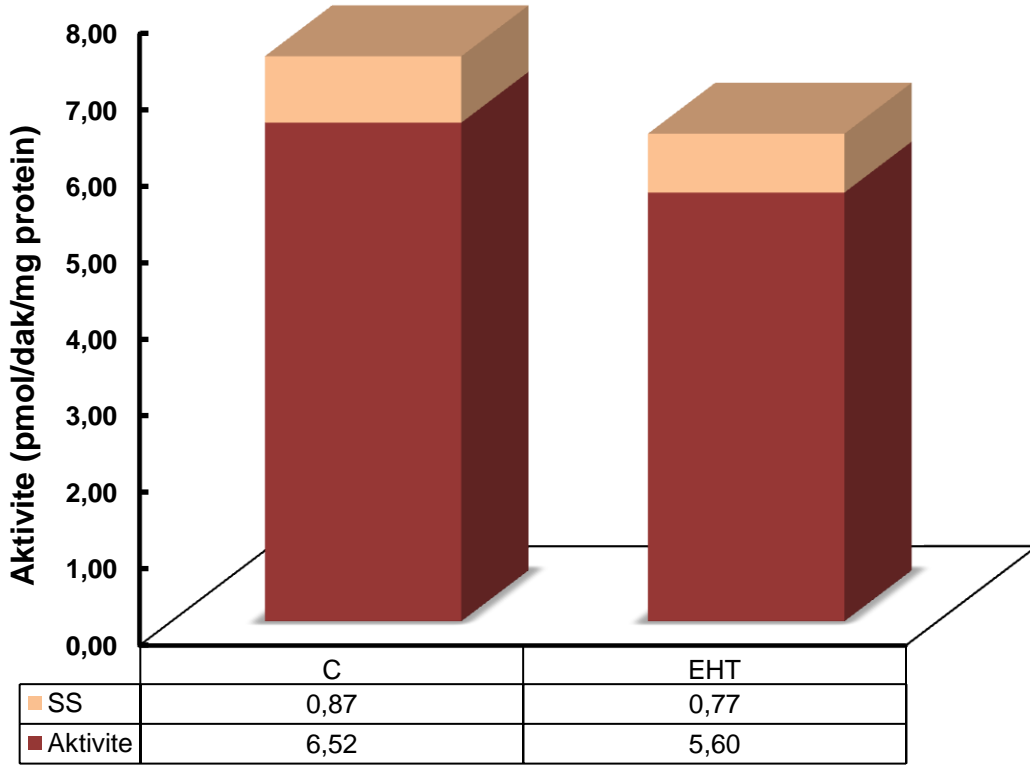
Tablo 14. Aromataz aktivitesi (DBFOD)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	9,96	5,90
C2	10,82	0,10
C3	5,95	0,63
C4	4,91	0,17
C5	5,84	0,18

C6	6,06	0,59
C7	5,99	0,00
C8	5,71	0,21
C9	5,83	0,51
C10	6,70	1,05
C11	5,77	0,05
C12	6,24	0,64
C13	5,86	2,07
C14	6,24	0,64
C15	5,89	0,29
EHT1	5,75	0,90
EHT2	4,94	2,86
EHT3	5,63	1,51
EHT4	6,40	0,01
EHT5	5,57	0,21
EHT6	6,01	0,01
EHT7	6,23	1,71
EHT8	6,00	0,86
EHT9	5,90	0,02
EHT10	5,65	1,05
EHT11	5,57	1,50
EHT12	5,98	0,81
EHT13	6,04	0,27
EHT14	6,10	1,34
EHT15	5,13	1,04
EHT16	5,12	0,37
EHT17	5,81	0,86
EHT18	5,96	1,03
EHT19	5,40	1,23
EHT20	4,95	0,20
EHT21	4,93	0,10
EHT22	4,95	0,08
EHT23	4,96	0,10
EHT24	5,20	1,29
EHT25	5,50	1,59
EHT26	4,98	0,14
EHT27	6,04	0,44
EHT28	6,21	0,04

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

Aromataz



Şekil 145. Aromataz aktivitesi (DBFOD)

3.4.3. N-Demetilaz Aktiviteleri

3.4.3.1. Aminopiren N-Demetilaz

Sitokrom P4502C sıçan doku mikrozomlarında aminopiren substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki aminopiren aktivitesi, Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 16 ve Şekil 16'da gösterilmektedir.

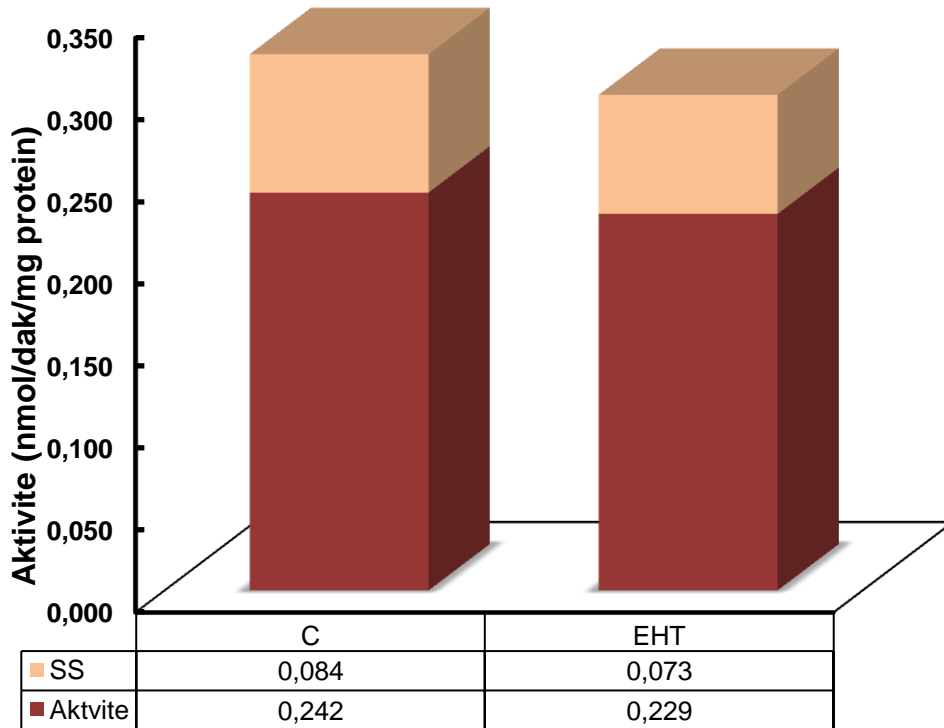
Tablo 15. Aminopiren N-demetilaz aktivitesi (APND)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,094	0,004
C2	0,085	0,000
C3	0,079	0,001
C4	0,194	0,000
C5	0,291	0,000
C6	0,291	0,017
C7	0,327	0,017
C8	0,267	0,017
C9	0,255	0,000
C10	0,261	0,009
C11	0,297	0,009
C12	0,291	0,017
C13	0,303	0,000
C14	0,309	0,009
C15	0,291	0,000
EHT1	0,042	0,002
EHT2	0,055	0,001
EHT3	0,261	0,009
EHT4	0,267	0,017
EHT5	0,261	0,009
EHT6	0,255	0,017
EHT7	0,285	0,009
EHT8	0,303	0,017
EHT9	0,309	0,009
EHT10	0,285	0,026
EHT11	0,327	0,017
EHT12	0,309	0,009
EHT13	0,291	0,000
EHT14	0,158	0,017
EHT15	0,188	0,009

EHT16	0,176	0,026
EHT17	0,170	0,000
EHT18	0,206	0,000
EHT19	0,182	0,017
EHT20	0,194	0,000
EHT21	0,230	0,017
EHT22	0,230	0,017
EHT23	0,145	0,017
EHT24	0,236	0,026
EHT25	0,261	0,009
EHT26	0,242	0,000
EHT27	0,279	0,017
EHT28	0,273	0,009

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

Aminopiren



Şekil 16. Aminopiren N-demetilaz aktivitesi (APND)

3.4.3.2. Benzfetamin N-Demetilaz (BPND)

Sitokrom P4502B sıçan doku mikrozoamlarında benzfetamin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozoamlarındaki benzfetamin aktivitesi, Ueng ve ark. (2002) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 17 ve Şekil 17’de gösterilmektedir.

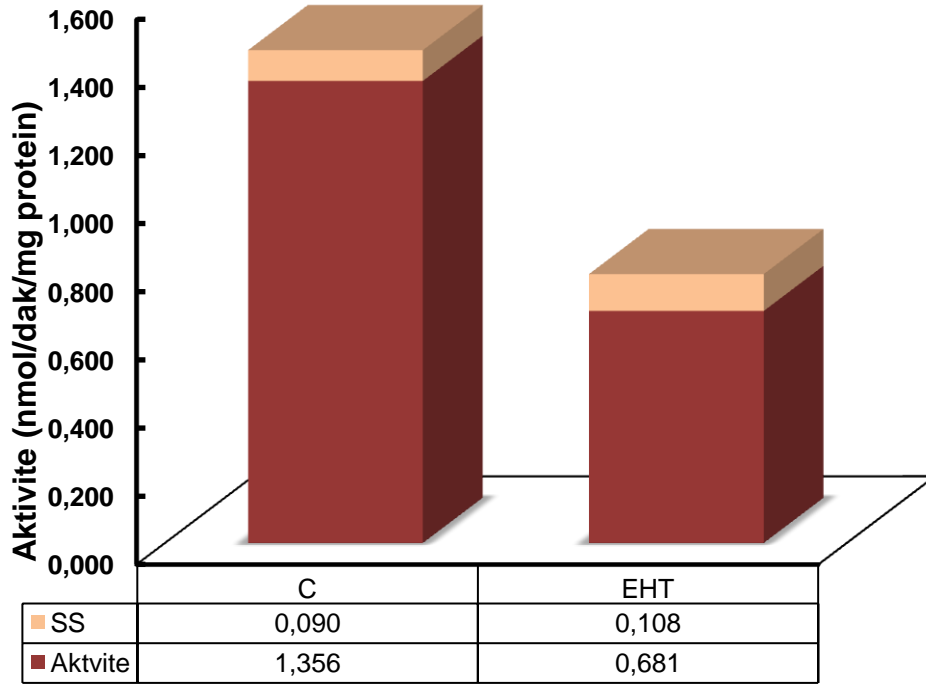
Tablo 16. Benzfetamin N-demetilaz aktivitesi (BPND)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,960	0,226
C2	1,000	0,057
C3	1,360	0,113
C4	1,160	0,057
C5	2,440	0,509
C6	1,200	0,000
C7	1,120	0,113
C8	1,040	0,057
C9	2,160	0,057
C10	1,880	0,028
C11	1,240	0,028
C12	1,340	0,032
C13	1,320	0,023
C14	1,020	0,043
C15	1,101	0,011
EHT1	0,880	0,113
EHT2	1,160	0,057
EHT3	1,360	0,226
EHT4	1,040	0,226
EHT5	0,440	0,170
EHT6	0,280	0,170
EHT7	0,600	0,283
EHT8	0,560	0,226
EHT9	0,800	0,113
EHT10	0,800	0,226

EHT11	0,640	0,226
EHT12	1,920	0,113
EHT13	0,560	0,000
EHT14	0,480	0,113
EHT15	0,400	0,226
EHT16	0,680	0,057
EHT17	0,720	0,000
EHT18	0,520	0,057
EHT19	0,880	0,000
EHT20	0,840	0,057
EHT21	0,360	0,170
EHT22	0,227	0,019
EHT23	0,800	0,057
EHT24	0,893	0,028
EHT25	0,480	0,000
EHT26	0,280	0,085
EHT27	0,034	0,002
EHT28	0,430	0,010

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

BPND



Şekil 17. Benzfetamin N-demetilaz aktivitesi (BPND)

3.4.3.3. Eritromisin N-Demetilaz (ERND)

Sitokrom P4503A sıçan doku mikrozomlarında eritromisin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki eritromisin aktivitesi, Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 18 ve Şekil 18'de gösterilmektedir.

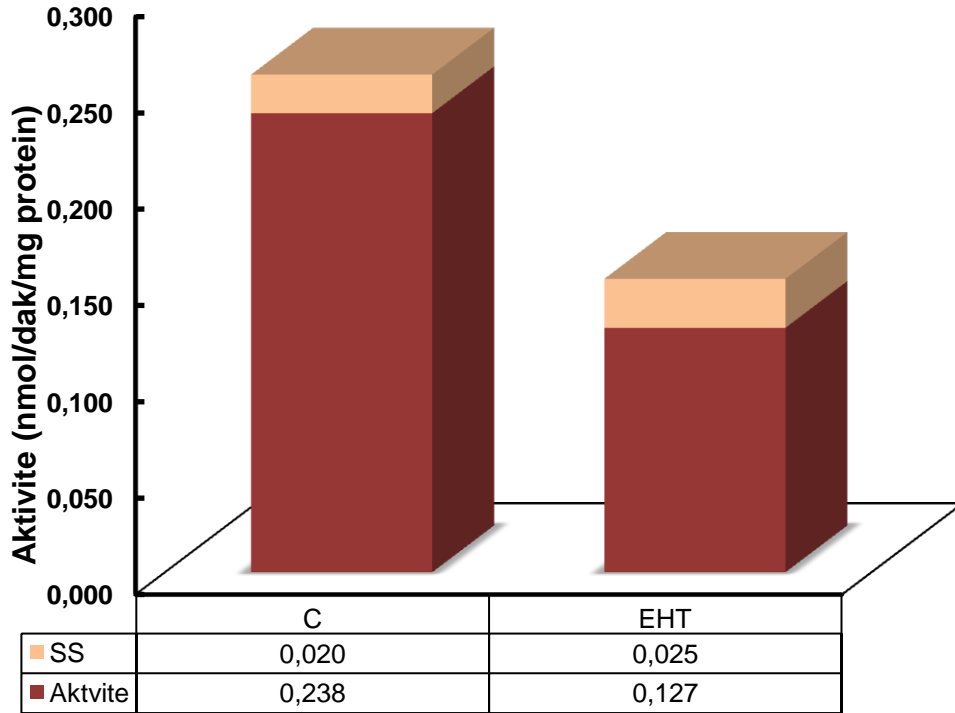
Tablo 17. Eritromisin N-demetilaz (ERND)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1-1	0,103	0,001
C1-2	0,070	0,001
C1-3	0,085	0,000
C1-4	0,055	0,001
C1-5	0,212	0,009
C1-6	0,309	0,009
C1-7	0,303	0,000
C1-8	0,321	0,009
C1-9	0,297	0,009
C1-10	0,297	0,026
C1-11	0,339	0,000
C1-12	0,309	0,009
C1-13	0,291	0,000
C1-14	0,315	0,000
C1-15	0,297	0,009
EHT-1	0,070	0,003
EHT-2	0,091	0,002
EHT3	0,145	0,017
EHT4	0,139	0,009
EHT5	0,152	0,009
EHT6	0,109	0,000
EHT7	0,115	0,009
EHT8	0,121	0,000
EHT9	0,115	0,009
EHT10	0,115	0,009

EHT11	0,097	0,017
EHT12	0,139	0,009
EHT13	0,158	0,017
EHT14	0,139	0,009
EHT15	0,115	0,009
EHT16	0,133	0,017
EHT17	0,115	0,009
EHT18	0,152	0,009
EHT19	0,158	0,017
EHT20	0,115	0,009
EHT21	0,133	0,000
EHT22	0,121	0,017
EHT23	0,127	0,009
EHT24	0,133	0,000
EHT25	0,164	0,026
EHT26	0,145	0,000
EHT27	0,133	0,017
EHT28	0,121	0,017

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

ErND



Şekil 18. Eritromisin N-demetilaz (ERND)

3.4.3.4. Etilmorfin N-Demetilaz (EmND)

Sitokrom P4502B sıçan doku mikrozomlarında eritromisin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki eritromisin aktivitesi, Cochlin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

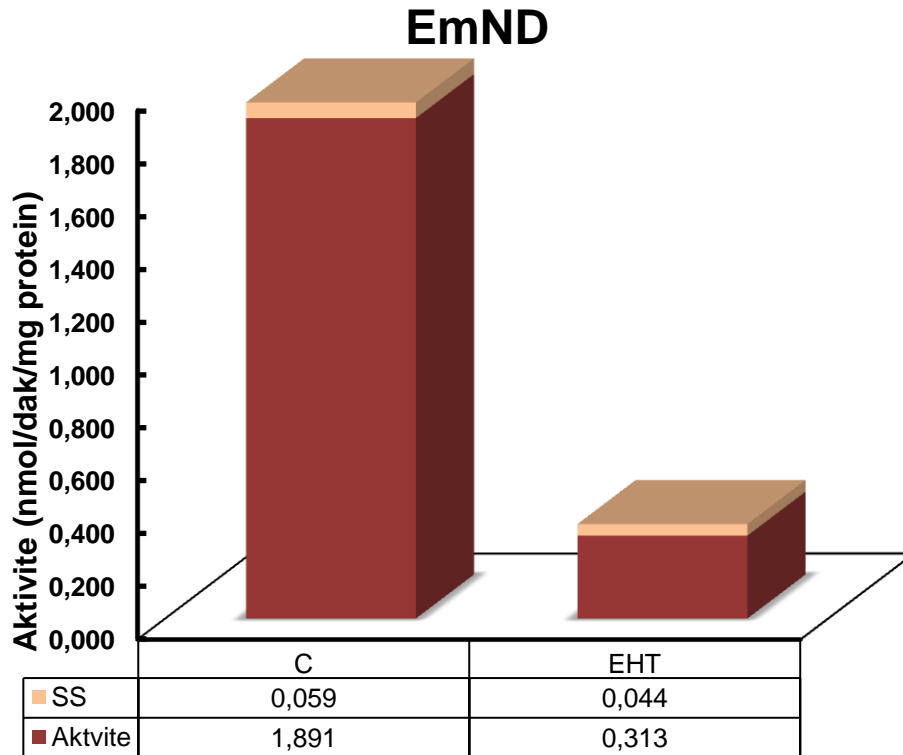
Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 19 ve Şekil 19'da gösterilmektedir.

Tablo 18. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi (EmND)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,954	0,144
C2	2,065	0,118
C3	3,083	0,013
C4	2,417	0,013
C5	4,056	0,026
C6	1,981	0,236
C7	1,074	0,013
C8	0,685	0,000
C9	3,000	0,039
C10	2,102	0,098
C11	1,676	0,059
C12	1,543	0,045
C13	1,342	0,030
C14	1,287	0,027
C15	1,098	0,021
EHT1	0,580	0,079
EHT2	0,333	0,026
EHT3	0,157	0,092
EHT4	0,620	0,065
EHT5	0,167	0,079
EHT6	0,491	0,065
EHT7	0,213	0,013
EHT8	0,111	0,052
EHT9	0,102	0,039
EHT10	0,130	0,052

EHT11	0,269	0,039
EHT12	0,167	0,000
EHT13	0,176	0,013
EHT14	0,157	0,013
EHT15	0,213	0,013
EHT16	0,491	0,065
EHT17	0,707	0,004
EHT18	0,241	0,079
EHT19	0,283	0,065
EHT20	0,259	0,105
EHT21	0,185	0,079
EHT22	0,241	0,052
EHT23	0,315	0,013
EHT24	0,725	0,020
EHT25	0,463	0,013
EHT26	0,398	0,007
EHT27	0,325	0,034
EHT28	0,245	0,043

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 19. Etildormin N-demetilaz aktivitesi (EmND)

3.4.3.5. Kafein N-Demetilaz (C3ND)

Sitokrom P4501A2 sıçan doku mikrozomlarında kafein substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki kafein aktivitesi, Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 20 ve Şekil 20'da gösterilmektedir.

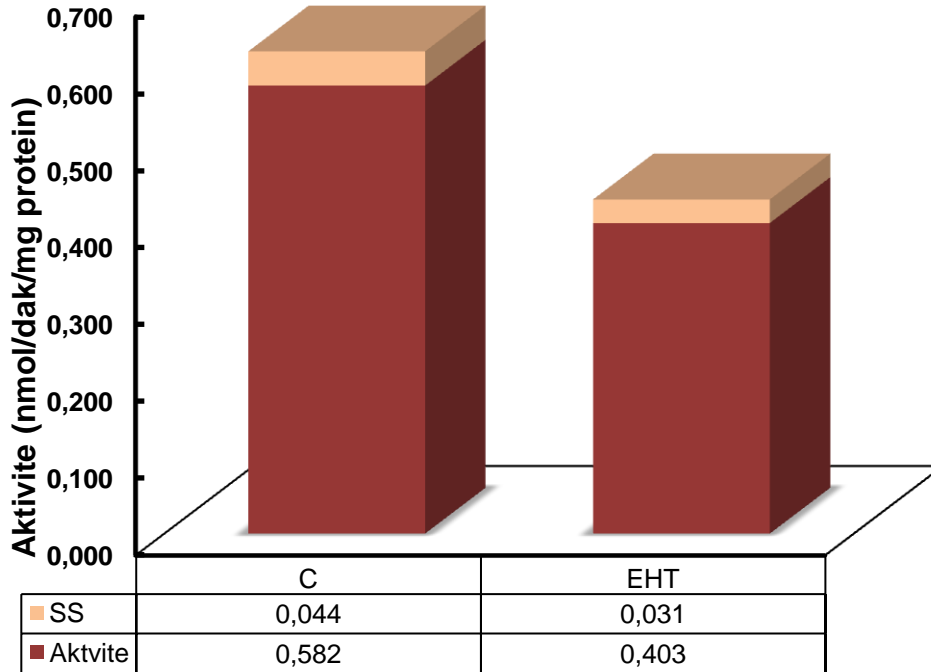
Tablo 20. Kafein N-demetilaz aktivitesi (C3ND)

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,100	0,004
C2	0,061	0,009
C3	0,042	0,002
C4	0,055	0,001
C5	0,800	0,051
C6	0,442	0,437
C7	0,770	0,043
C8	0,794	0,009
C9	0,830	0,009
C10	0,897	0,034
C11	0,800	0,017
C12	0,745	0,026
C13	0,745	0,009
C14	0,794	0,009
C15	0,855	0,009
EHT1	0,030	0,008
EHT2	0,061	0,000
EHT3	0,503	0,009
EHT4	0,352	0,017
EHT5	0,436	0,000
EHT6	0,455	0,009
EHT7	0,291	0,034
EHT8	0,467	0,043
EHT9	0,515	0,043
EHT10	0,539	0,077

EHT11	0,655	0,069
EHT12	0,612	0,094
EHT13	0,448	0,051
EHT14	0,400	0,017
EHT15	0,461	0,034
EHT16	0,267	0,069
EHT17	0,303	0,034
EHT18	0,406	0,009
EHT19	0,491	0,043
EHT20	0,364	0,017
EHT21	0,352	0,017
EHT22	0,412	0,069
EHT23	0,364	0,017
EHT24	0,358	0,026
EHT25	0,436	0,000
EHT26	0,461	0,034
EHT27	0,448	0,017
EHT28	0,412	0,000

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

C3ND



Şekil 20. Kafein N-demetilaz aktivitesi (C3ND)

3.4.3.6. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA)

Sitokrom P4502E sıçan doku mikrozomlarında nitrosodimetilamin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki NDMA aktivitesi, Cochlin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi.

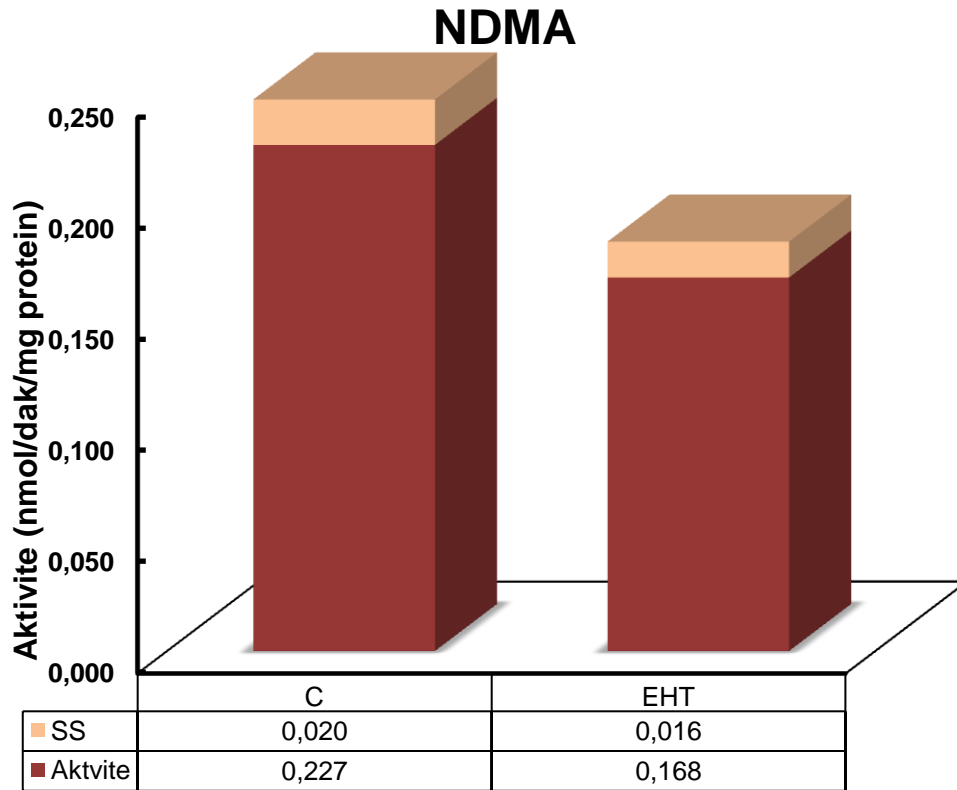
Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 21 ve Şekil 21’de gösterilmektedir.

Tablo 19. NDMA aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,269	0,009
C2	0,180	0,028
C3	0,242	0,009
C4	0,127	0,028
C5	0,160	0,038
C6	0,180	0,028
C7	0,240	0,028
C8	0,227	0,009
C9	0,253	0,009
C10	0,307	0,009
C11	0,233	0,005
C12	0,240	0,019
C13	0,340	0,028
C14	0,213	0,000
C15	0,200	0,057
EHT1	0,140	0,009
EHT2	0,200	0,019
EHT3	0,107	0,019
EHT4	0,224	0,035
EHT5	0,171	0,016
EHT6	0,160	0,000
EHT7	0,147	0,038
EHT8	0,153	0,009
EHT9	0,167	0,009
EHT10	0,153	0,009

EHT11	0,173	0,019
EHT12	0,173	0,038
EHT13	0,160	0,019
EHT14	0,187	0,019
EHT15	0,147	0,000
EHT16	0,140	0,009
EHT17	0,180	0,047
EHT18	0,120	0,019
EHT19	0,167	0,028
EHT20	0,113	0,009
EHT21	0,180	0,009
EHT22	0,147	0,019
EHT23	0,187	0,009
EHT24	0,304	0,005
EHT25	0,180	0,005
EHT26	0,180	0,014
EHT27	0,156	0,006
EHT28	0,183	0,013

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 21. NDMA aktivitesi

3.4.4. Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri

3.4.4.1. Benziloksirezorufin O-Dealkilaz (BROD) Aktivitesi

Sitokrom P4502B sıçan doku mikrozomlarında 7-benziloksirezorufin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki BROD aktivitesi, Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanıldı.

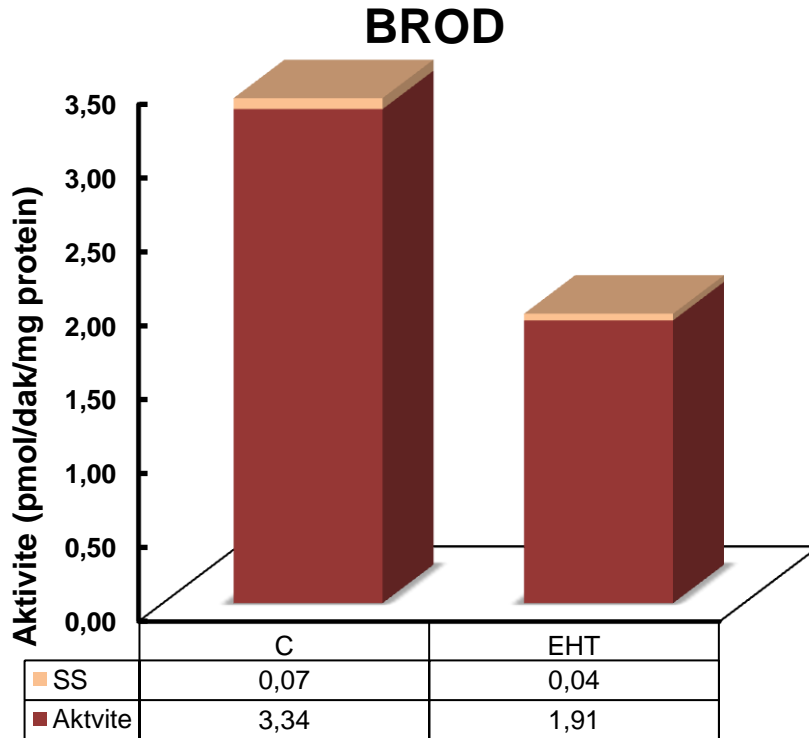
Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 22 ve Şekil 22'de gösterilmektedir.

Tablo 20. BROD Aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	1,50	0,00
C2	1,08	0,04
C3	2,51	0,00
C4	1,68	0,06
C5	2,56	0,16
C6	3,57	0,24
C7	3,57	0,22
C8	2,10	0,33
C9	7,98	0,27
C10	3,35	0,08
C11	3,61	0,21
C12	3,58	0,25
C13	5,78	0,04
C14	4,16	0,00
C15	3,14	0,12
EHT1	0,50	0,59
EHT2	1,21	0,16
EHT3	1,00	0,02
EHT4	1,82	0,07
EHT5	2,65	0,31
EHT6	2,82	0,38
EHT7	2,50	0,09
EHT8	2,56	0,06
EHT9	1,52	0,16
EHT10	1,17	0,04

EHT11	2,09	0,10
EHT12	2,27	0,22
EHT13	1,17	0,18
EHT14	2,19	0,49
EHT15	2,04	0,89
EHT16	2,18	0,10
EHT17	3,07	0,38
EHT18	1,54	0,23
EHT19	1,23	0,28
EHT20	0,95	0,22
EHT21	2,57	0,29
EHT22	1,57	0,40
EHT23	2,36	0,28
EHT24	2,48	0,25
EHT25	2,14	0,45
EHT26	2,32	0,54
EHT27	1,76	0,92
EHT28	1,94	0,08

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 22. BROD aktivitesi

3.4.4.2. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivitesi

Sitokrom P4501A1 sıçan doku mikrozomlarında 7-etoksirezorufin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki EROD aktivitesi, Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanıldı.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 23 ve Şekil 23'te gösterilmektedir.

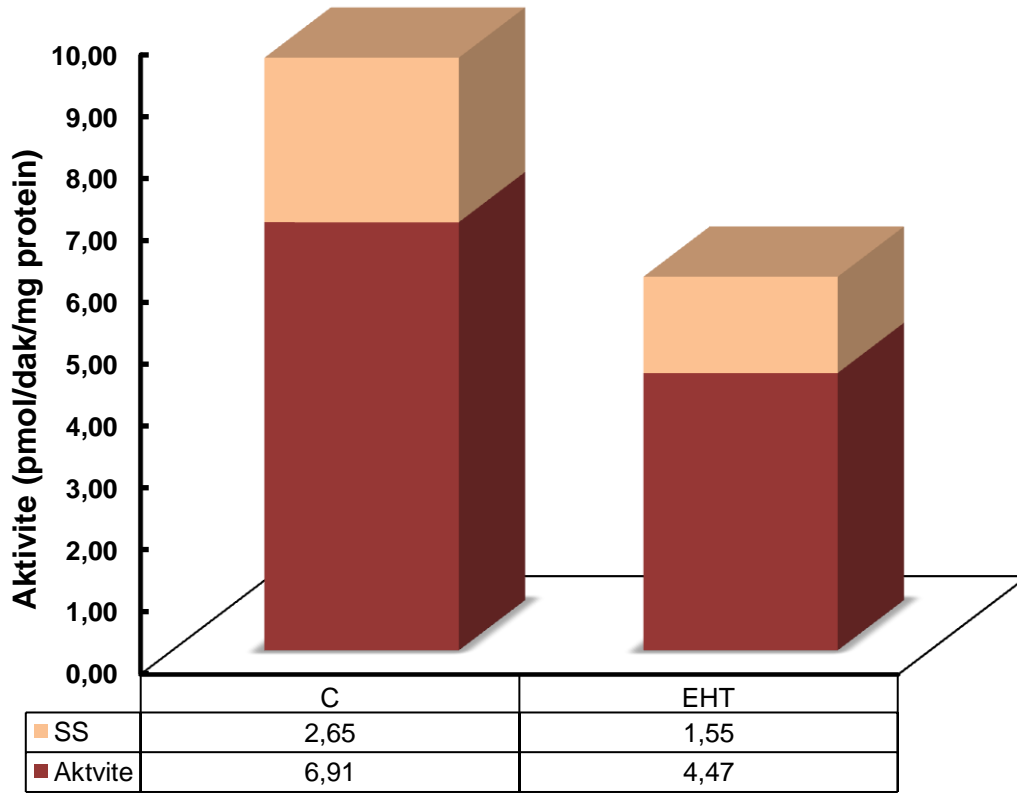
Tablo 21. EROD aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	5,60	0,62
C2	6,33	0,09
C3	12,02	1,59
C4	5,23	0,04
C5	5,80	0,78
C6	5,41	0,81
C7	5,24	0,46
C8	5,42	0,13
C9	12,45	0,97
C10	3,17	0,18
C11	6,57	0,17
C12	6,57	0,08
C13	8,87	0,25
C14	6,37	0,13
C15	8,58	0,33
EHT1	5,50	0,12
EHT2	4,10	0,57
EHT3	3,16	0,66
EHT4	2,67	0,10
EHT5	2,19	0,62
EHT6	3,58	0,45
EHT7	3,42	0,96
EHT8	2,23	0,09
EHT9	5,44	0,47
EHT10	5,93	0,41
EHT11	5,82	0,25
EHT12	2,53	0,03

EHT13	5,40	0,10
EHT14	4,52	0,28
EHT15	4,81	0,50
EHT16	4,69	0,59
EHT17	7,01	0,13
EHT18	4,92	0,04
EHT19	5,71	0,53
EHT20	3,00	0,12
EHT21	5,80	0,16
EHT22	4,44	0,35
EHT23	7,79	0,22
EHT24	7,32	0,44
EHT25	4,38	0,21
EHT26	4,82	0,33
EHT27	3,36	0,74
EHT28	5,05	0,25

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

EROD



Şekil 23. EROD aktivitesi

3.4.4.3. Metoksirezorufin O-Dealkilaz (MROD) Aktivitesi

Sitokrom P4501A2 sıçan doku mikrozomlarında 7-metoksirezorufin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki MROD aktivitesi, Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanıldı.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 24 ve Şekil 24'te gösterilmektedir.

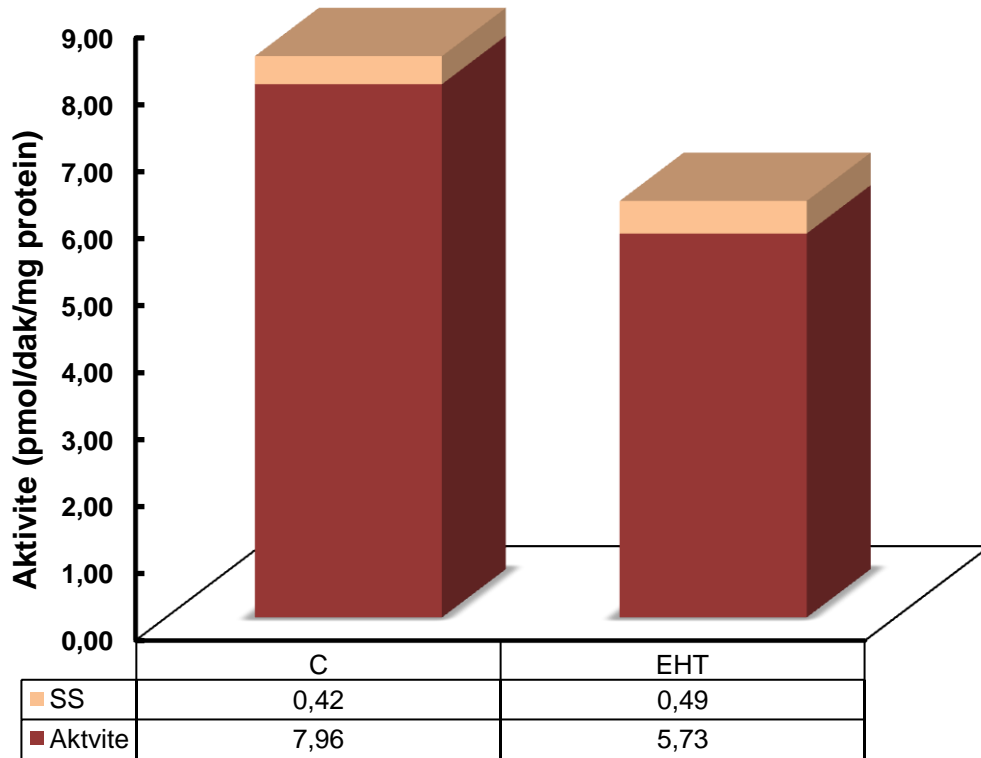
Tablo 22. MROD aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	7,54	0,75
C2	9,26	0,44
C3	6,52	0,00
C4	16,34	0,96
C5	2,58	0,46
C6	4,99	0,24
C7	3,81	0,27
C8	19,61	0,96
C9	7,42	0,50
C10	6,99	0,78
C11	7,51	0,30
C12	5,47	0,42
C13	6,67	0,12
C14	7,52	0,01
C15	7,17	0,08
EHT1	5,47	0,94
EHT2	5,43	0,37
EHT3	9,99	0,78
EHT4	7,67	0,49
EHT5	8,48	0,77
EHT6	4,66	0,44
EHT7	4,22	0,53
EHT8	5,97	1,00
EHT9	7,79	0,14
EHT10	4,35	0,29
EHT11	6,72	0,75
EHT12	5,51	0,35

EHT13	6,54	0,43
EHT14	4,37	0,69
EHT15	3,48	0,57
EHT16	2,37	0,11
EHT17	6,28	0,70
EHT18	7,01	0,69
EHT19	6,33	0,44
EHT20	3,48	0,38
EHT21	4,86	0,30
EHT22	2,50	0,26
EHT23	7,78	1,03
EHT24	6,11	0,74
EHT25	6,14	0,08
EHT26	5,95	0,08
EHT27	5,39	0,08
EHT28	5,65	0,13

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

MROD



Şekil 24. MROD aktivitesi

3.4.4.4. Pentiloksirezorufin O-Dealkilaz (PROD) Aktivitesi

Sitokrom P4502B sıçan doku mikrozomlarında 7-pentiloksirezorufin substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi. Doku mikrozomlarındaki PROD aktivitesi, Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanıldı.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 25 ve Şekil 25'te gösterilmektedir.

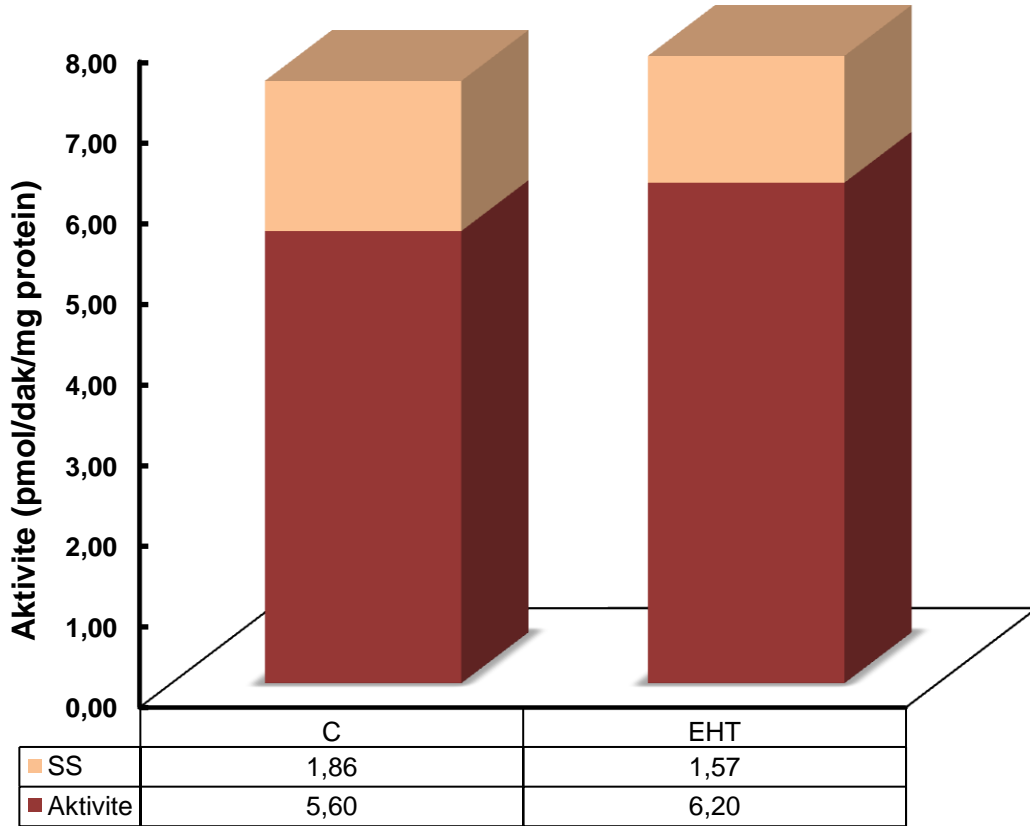
Tablo 23. PROD aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	7,54	0,75
C2	9,26	0,44
C3	6,52	0,00
C4	16,34	0,96
C5	2,58	0,46
C6	4,99	0,24
C7	3,81	0,27
C8	19,61	0,96
C9	7,42	0,50
C10	6,99	0,78
C11	7,51	0,30
C12	5,47	0,42
C13	6,67	0,12
C14	7,52	0,01
C15	7,17	0,08
EHT1	5,47	0,94
EHT2	5,43	0,37
EHT3	9,99	0,78
EHT4	7,67	0,49
EHT5	8,48	0,77
EHT6	4,66	0,44
EHT7	4,22	0,53
EHT8	5,97	1,00
EHT9	7,79	0,14
EHT10	4,35	0,29
EHT11	6,72	0,75
EHT12	5,51	0,35

EHT13	6,54	0,43
EHT14	4,37	0,69
EHT15	3,48	0,57
EHT16	2,37	0,11
EHT17	6,28	0,70
EHT18	7,01	0,69
EHT19	6,33	0,44
EHT20	3,48	0,38
EHT21	4,86	0,30
EHT22	2,50	0,26
EHT23	7,78	1,03
EHT24	6,11	0,74
EHT25	6,14	0,08
EHT26	5,95	0,08
EHT27	5,39	0,08
EHT28	5,65	0,13

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

PROD



Şekil 25. PROD aktivitesi

3.4.4.5. N-Nitroza Kinon OksidoRedüktaz (NQO1) Aktivitesi

Hazırlanan doku sitozollerinde NQO1 aktivitesi 2,6-diklorofenolindofenol (DCPIP) substratı kullanılarak Ernster ve ark. (1960) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi.

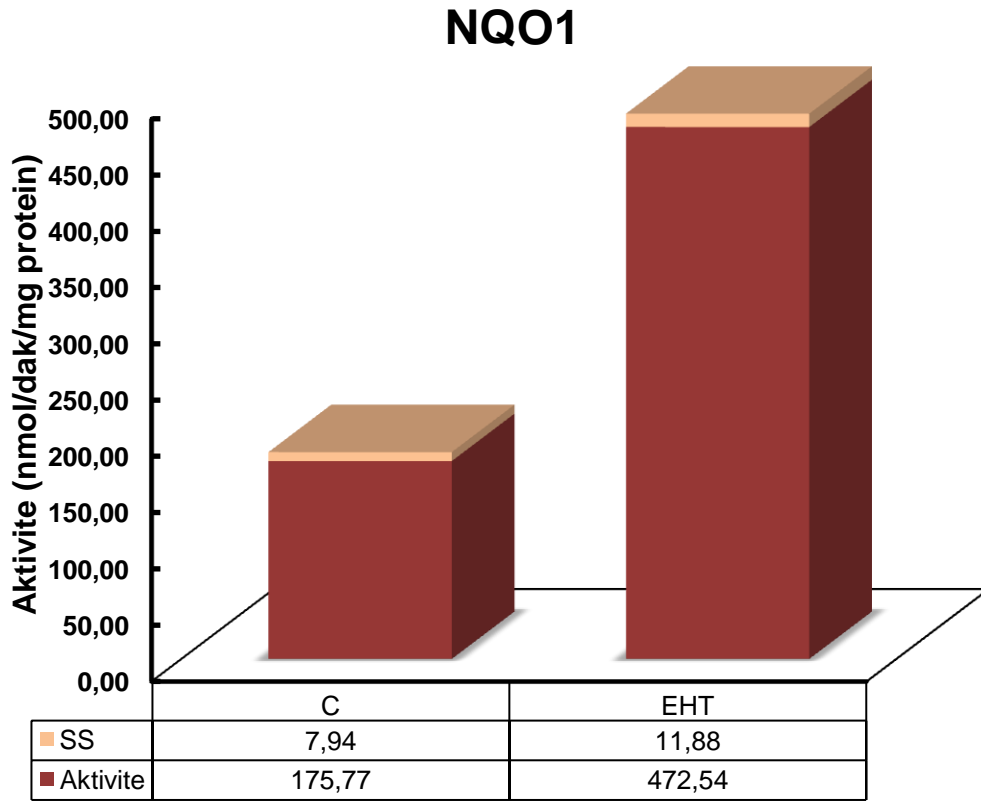
Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 26 ve Şekil 26'da gösterilmektedir.

Tablo 24. NQO1 aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	56,79	3,71
C2	105,37	14,62
C3	238,47	2,36
C4	227,23	3,71
C5	82,17	6,40
C6	270,01	3,81
C7	72,31	10,47
C8	249,82	5,29
C9	326,11	6,31
C10	107,32	18,66
C11	120,00	3,76
C12	222,00	3,87
C13	145,00	10,10
C14	104,00	15,53
C15	310,00	10,46
EHT1	796,92	12,64
EHT2	511,02	43,08
EHT3	399,45	23,02
EHT4	585,48	20,20
EHT5	397,65	0,83
EHT6	525,35	5,43
EHT7	784,56	21,91
EHT8	873,51	8,68
EHT9	610,56	1,47
EHT10	744,26	2,61
EHT11	605,41	13,88
EHT12	402,03	9,78

EHT13	651,16	43,28
EHT14	430,12	5,13
EHT15	593,31	73,89
EHT16	563,10	12,13
EHT17	565,34	7,56
EHT18	536,78	1,25
EHT19	480,94	0,59
EHT20	709,44	13,37
EHT21	415,80	2,98
EHT22	312,52	2,13
EHT23	384,12	5,29
EHT24	329,10	1,06
EHT25	6,14	0,08
EHT26	5,95	0,08
EHT27	5,39	0,08
EHT28	5,65	0,13

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 26. NQO1 aktivitesi

3.4.4.6. Glutasyon S-Transferaz Aktiviteleri

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), etakrinik asit (EA), 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Şen ve Kırıkbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edildi. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 27-30 ve Şekil 27-30'da gösterilmektedir.

3.4.4.6.1. GST- CDNB

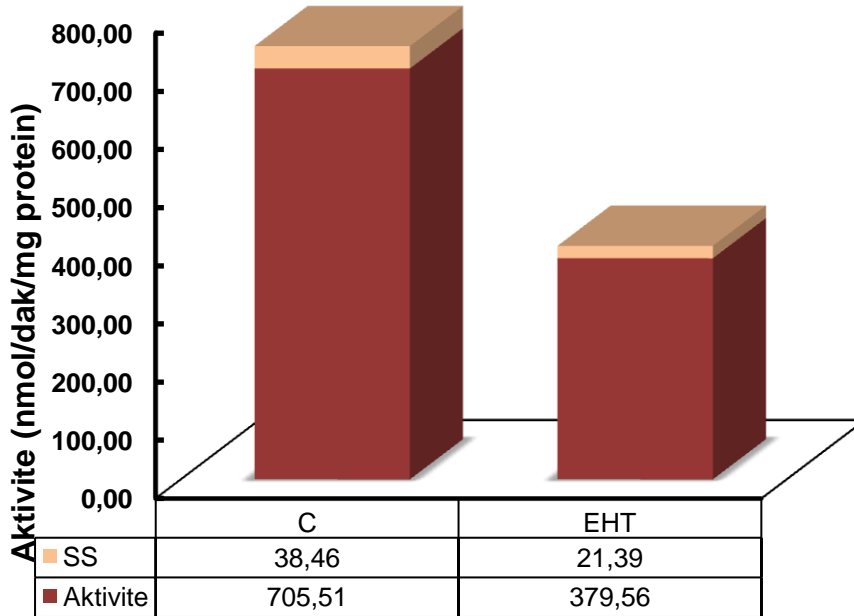
Tablo 25. GST- CDNB aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	907,34	23,90
C2	754,20	47,96
C3	828,42	19,06
C4	736,70	67,65
C5	712,05	65,37
C6	598,36	40,98
C7	707,23	38,56
C8	473,99	73,49
C9	396,83	38,47
C10	763,37	29,43
C11	845,39	31,67
C12	801,27	10,08
C13	722,10	11,14
C14	727,32	69,05
C15	608,14	10,13
EHT1	166,33	58,81
EHT2	440,03	7,68
EHT3	398,02	5,93
EHT4	509,87	20,68
EHT5	307,84	57,97
EHT6	339,29	47,09
EHT7	364,28	60,70

EHT8	301,19	41,93
EHT9	320,35	5,85
EHT10	295,19	66,07
EHT11	264,20	10,38
EHT12	329,84	7,71
EHT13	303,63	9,92
EHT14	394,94	34,74
EHT15	475,20	23,85
EHT16	406,09	2,41
EHT17	400,47	27,57
EHT18	239,80	15,68
EHT19	386,89	4,27
EHT20	328,37	13,76
EHT21	455,39	22,34
EHT22	441,75	10,75
EHT23	464,90	31,14
EHT24	482,12	9,38
EHT25	455,50	1,59
EHT26	434,98	0,14
EHT27	456,04	0,44
EHT28	465,21	0,04

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

GST-CDNB



Şekil 27. GST- CDNB aktivitesi

3.4.4.6.2. GST- DCNB

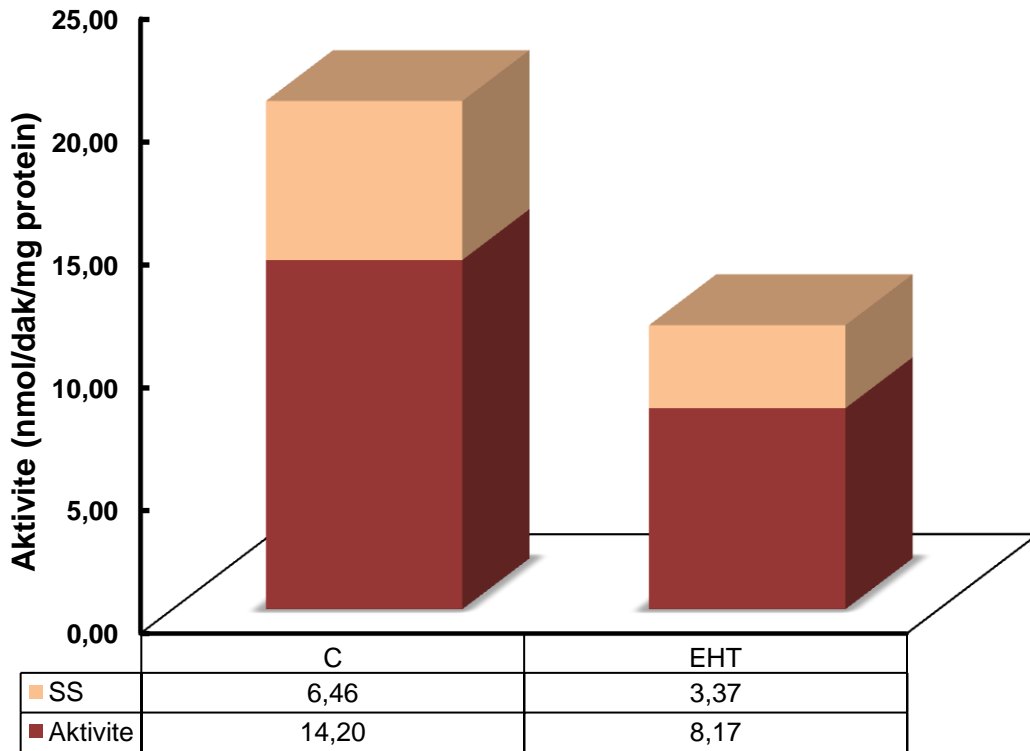
Tablo 26. GST- DCNB aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	1,58	0,00
C2	2,24	0,07
C3	10,24	11,88
C4	13,30	0,08
C5	15,28	0,17
C6	12,25	0,21
C7	13,36	0,18
C8	14,10	0,10
C9	12,66	0,18
C10	11,90	0,02
C11	20,14	0,44
C12	20,02	0,27
C13	22,43	3,23
C14	20,66	1,45
C15	22,81	0,62
EHT1	14,59	0,13
EHT2	21,89	0,53
EHT3	3,89	0,15
EHT4	7,92	0,07
EHT5	5,75	0,07
EHT6	5,03	1,02
EHT7	5,97	0,05
EHT8	8,75	0,27
EHT9	6,17	0,42
EHT10	7,90	0,13
EHT11	6,58	0,12
EHT12	7,51	0,06
EHT13	7,69	0,26
EHT14	7,47	0,65
EHT15	9,88	0,36
EHT16	4,60	0,22
EHT17	9,62	0,29
EHT18	8,53	0,13
EHT19	6,79	0,13

EHT20	7,33	0,10
EHT21	7,56	0,00
EHT22	6,78	0,15
EHT23	8,03	0,06
EHT24	6,44	0,11
EHT25	9,40	0,23
EHT26	9,82	1,60
EHT27	8,98	0,53
EHT28	7,97	0,43

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

GST-DCNB



Şekil 28. GST- DCNB aktivitesi

3.4.4.6.3. GST- EA

Tablo 27. GST- EA aktivitesi

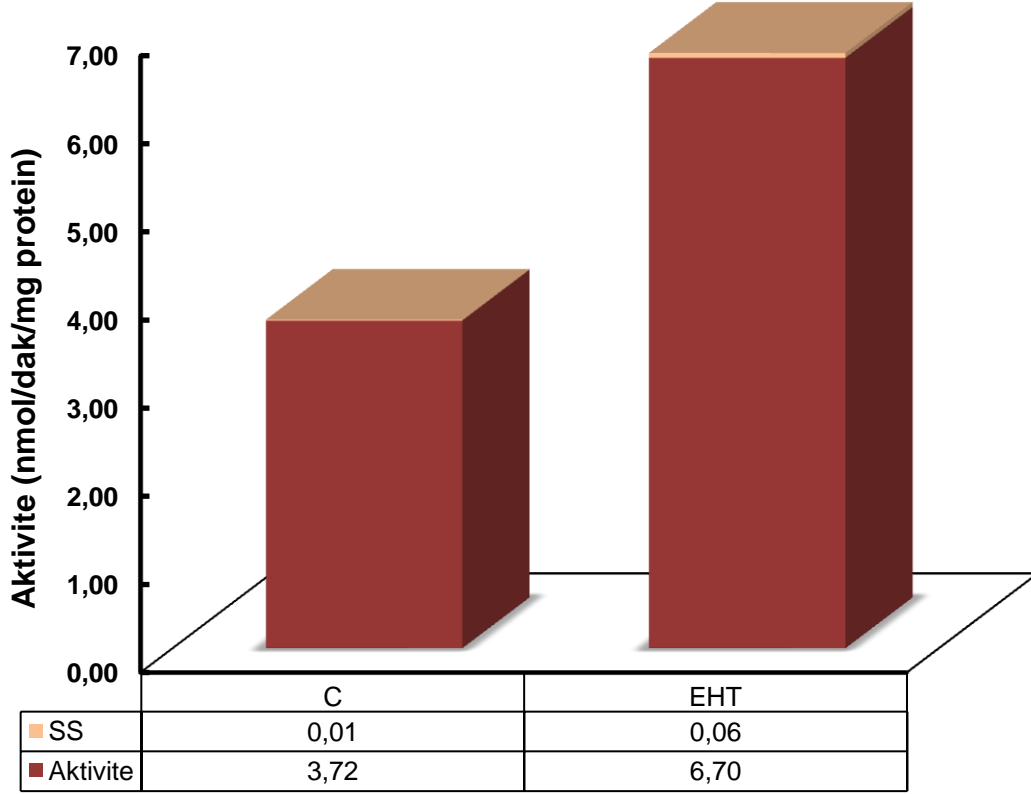
Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	2,392	0,072

C2	3,527	0,074
C3	2,833	0,092
C4	2,994	0,079
C5	3,453	0,362
C6	3,467	0,133
C7	5,880	0,326
C8	5,309	0,050
C9	4,241	0,193
C10	4,975	0,459
C11	3,273	0,119
C12	3,906	0,057
C13	3,045	0,193
C14	2,754	0,223
C15	3,705	0,119
EHT1	3,141	0,159
EHT2	4,457	0,164
EHT3	5,064	0,901
EHT4	4,310	0,578
EHT5	3,624	0,165
EHT6	4,953	0,151
EHT7	4,688	0,439
EHT8	7,392	0,903
EHT9	6,851	0,114
EHT10	8,895	0,740
EHT11	6,253	1,019
EHT12	9,555	0,965
EHT13	5,774	0,190
EHT14	5,161	0,718
EHT15	12,990	0,077
EHT16	7,472	0,213
EHT17	6,053	0,675
EHT18	9,467	1,021
EHT19	5,925	0,331
EHT20	6,901	0,048
EHT21	5,057	1,036
EHT22	3,554	0,190
EHT23	5,337	0,168
EHT24	5,661	0,211
EHT25	7,316	0,493

EHT26	9,264	0,088
EHT27	12,611	0,356
EHT28	9,824	0,166

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

GST-EA



Şekil 29. GST-EA aktivitesi

3.4.4.6.4. GST- EPNP

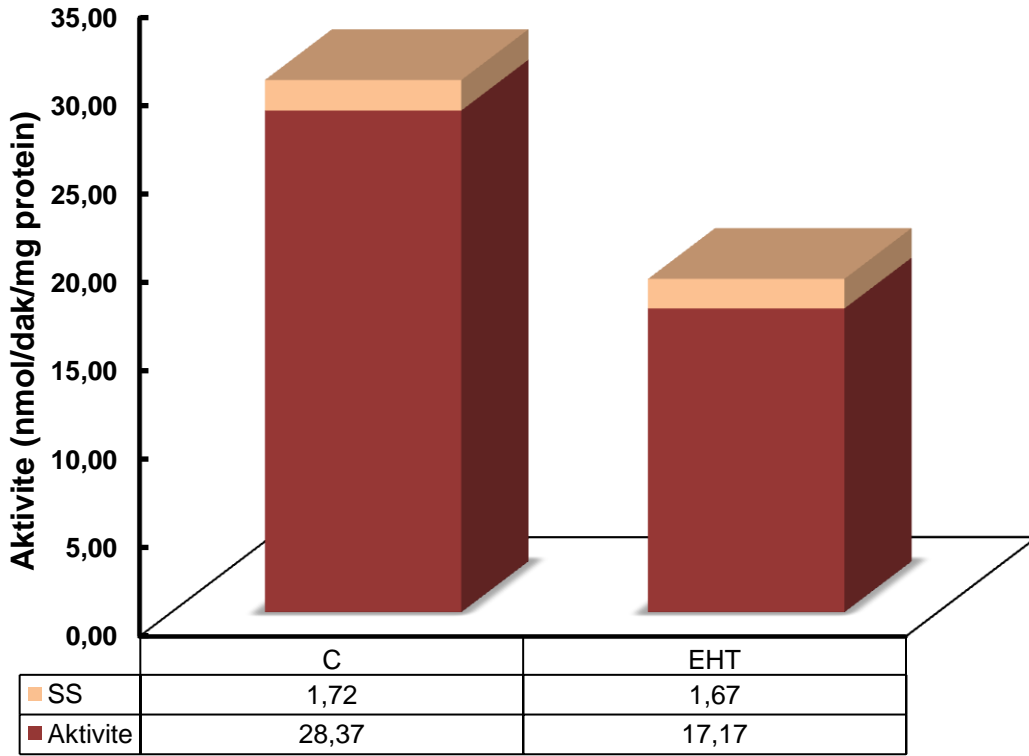
Tablo 28. GST- EPNP aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	24,66	1,15
C2	24,66	2,96
C3	25,80	3,98
C4	25,80	0,32
C5	26,28	0,00
C6	26,28	4,14

C7	26,13	0,44
C8	26,13	1,92
C9	37,86	1,09
C10	37,86	2,82
C11	40,98	2,26
C12	40,98	1,23
C13	24,45	0,85
C14	24,45	2,11
C15	13,23	0,55
EHT1	24,35	1,61
EHT2	27,54	0,00
EHT3	22,60	0,85
EHT4	20,86	0,70
EHT5	22,12	0,72
EHT6	20,92	0,12
EHT7	12,11	2,68
EHT8	15,09	3,81
EHT9	20,06	0,13
EHT10	19,29	2,69
EHT11	9,89	0,23
EHT12	12,18	0,61
EHT13	12,68	0,56
EHT14	12,68	4,10
EHT15	16,78	2,31
EHT16	17,98	3,01
EHT17	18,85	1,25
EHT18	17,86	0,49
EHT19	26,50	1,65
EHT20	25,48	2,55
EHT21	13,56	2,20
EHT22	13,39	2,02
EHT23	9,16	0,10
EHT24	12,95	0,00
EHT25	17,89	2,14
EHT26	12,51	1,13
EHT27	12,70	8,19
EHT28	12,88	0,96

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

GST-EPNP



Şekil 30. GST- EPNP aktivitesi

3.4.4.7. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

3.4.4.7.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi

Katalaz enziminin aktivite ölçümü S1.5 fraksiyonunda Abei (1974) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edildi. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 31 ve Şekil 31'de gösterilmektedir.

Tablo 29. Katalaz aktivitesi

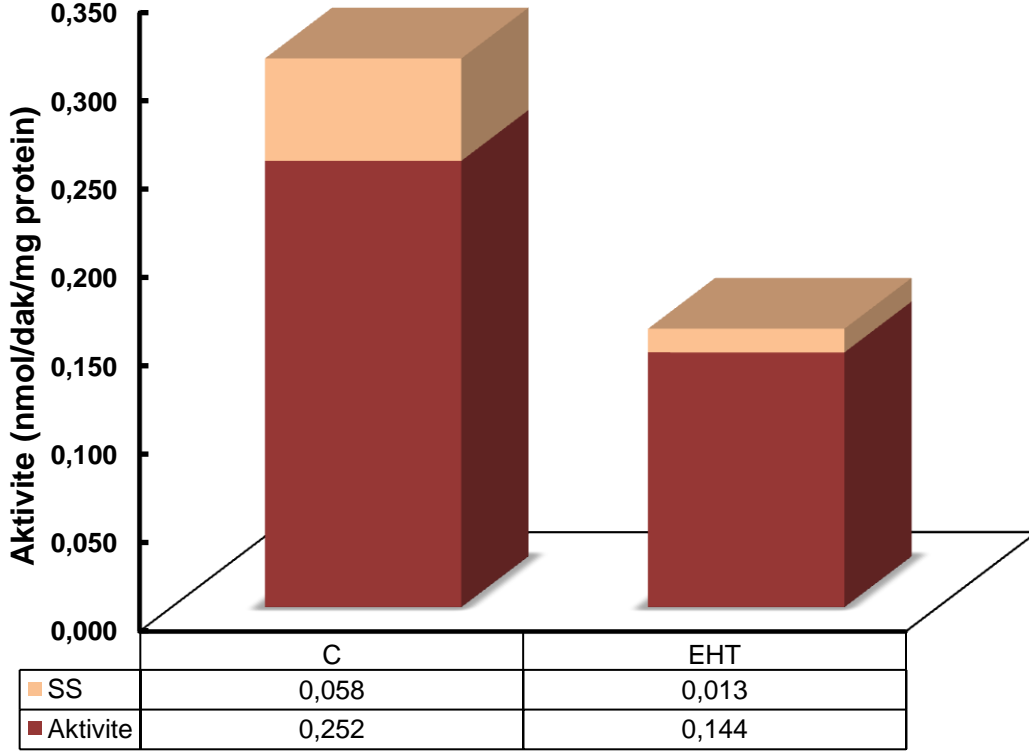
Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,220	0,005
C2	0,211	0,001

C3	0,127	0,002
C4	0,161	0,003
C5	0,166	0,002
C6	0,184	0,001
C7	0,261	0,440
C8	0,261	0,092
C9	0,379	0,086
C10	0,386	0,028
C11	0,410	0,023
C12	0,398	0,023
C13	0,245	0,085
C14	0,245	0,021
C15	0,132	0,055
EHT1	0,038	0,001
EHT2	0,124	0,005
EHT3	0,192	0,024
EHT4	0,129	0,001
EHT5	0,121	0,005
EHT6	0,050	0,001
EHT7	0,117	0,001
EHT8	0,209	0,036
EHT9	0,092	0,002
EHT10	0,106	0,004
EHT11	0,123	0,006
EHT12	0,181	0,007
EHT13	0,121	0,001
EHT14	0,237	0,024
EHT15	0,189	0,016
EHT16	0,153	0,013
EHT17	0,196	0,001
EHT18	0,222	0,000
EHT19	0,129	0,002
EHT20	0,162	0,001
EHT21	0,181	0,004
EHT22	0,115	0,003
EHT23	0,159	0,010
EHT24	0,130	0,001
EHT25	0,179	0,014
EHT26	0,125	0,011

EHT27	0,127	0,082
EHT28	0,129	0,096

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

Katalaz



Şekil 31. Katalaz aktivitesi

3.4.4.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

SOD enziminin aktivite ölçümü Marklund ve Marklund (1974) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edildi. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite unite/dak/mg protein olarak Tablo 32 ve Şekil 32’de gösterilmektedir.

Tablo 30. SOD aktivitesi

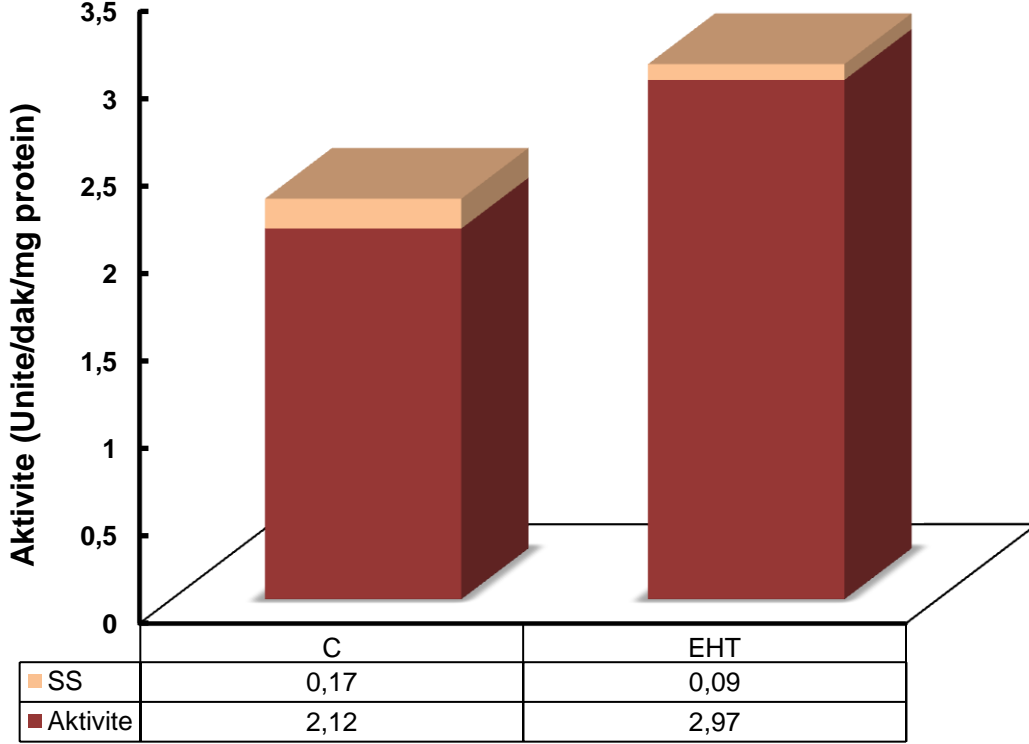
Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Unite/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	2,84	0,14
C2	2,54	0,13

C3	1,96	0,10
C4	2,19	0,00
C5	2,42	0,02
C6	2,64	0,13
C7	1,44	0,02
C8	2,71	0,04
C9	1,93	0,06
C10	2,11	0,10
C11	1,20	3,76
C12	2,22	3,87
C13	1,45	10,10
C14	1,04	15,53
C15	3,10	10,46
EHT1	0,68	0,05
EHT2	2,48	0,00
EHT3	2,34	0,03
EHT4	2,78	0,06
EHT5	1,69	0,14
EHT6	1,64	0,09
EHT7	1,14	0,01
EHT8	1,15	0,08
EHT9	1,83	0,04
EHT10	1,39	0,12
EHT11	2,44	0,02
EHT12	1,52	0,00
EHT13	1,84	0,16
EHT14	1,96	0,03
EHT15	1,44	0,02
EHT16	1,92	0,10
EHT17	2,15	0,04
EHT18	2,47	0,24
EHT19	2,48	0,02
EHT20	1,71	13,37
EHT21	1,42	2,98
EHT22	1,31	2,13
EHT23	1,38	5,29
EHT24	1,33	1,06
EHT25	1,61	0,08
EHT26	1,52	0,08

EHT27	1,54	0,08
EHT28	1,56	0,13

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

SOD



Şekil 32. SOD aktivitesi

3.4.4.7.3. Glutasyon Peroksidaz (GP_x) Aktivitesi

GP_x enziminin aktivite ölçümü Paglia ve Valentine (1967) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edildi. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlendi.

Kontrol ve EHT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite unite/dak/mg protein olarak Tablo 33 ve Şekil 33'de gösterilmektedir.

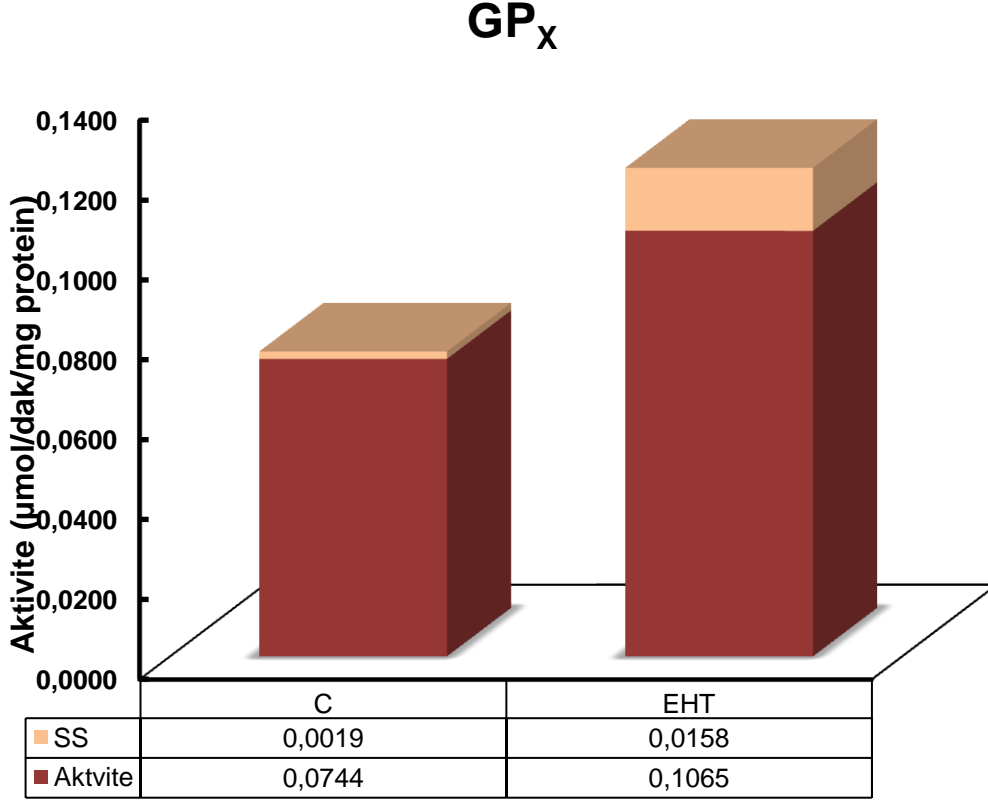
Tablo 31. GP_x aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (µmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
C1	0,087	0,002

C2	0,081	0,006
C3	0,072	0,000
C4	0,072	0,001
C5	0,051	0,002
C6	0,048	0,000
C7	0,079	0,001
C8	0,146	0,002
C9	0,087	0,003
C10	0,067	0,001
C11	0,070	0,002
C12	0,069	0,001
C13	0,064	0,002
C14	0,063	0,001
C15	0,060	0,003
EHT1	0,174	0,003
EHT2	0,095	0,006
EHT3	0,109	0,011
EHT4	0,094	0,006
EHT5	0,079	0,003
EHT6	0,089	0,002
EHT7	0,123	0,000
EHT8	0,158	0,002
EHT9	0,122	0,001
EHT10	0,115	0,001
EHT11	0,093	0,004
EHT12	0,081	0,001
EHT13	0,113	0,001
EHT14	0,106	0,002
EHT15	0,115	0,000
EHT16	0,088	0,002
EHT17	0,092	0,001
EHT18	0,078	0,003
EHT19	0,082	0,001
EHT20	0,136	0,004
EHT21	0,060	0,002
EHT22	0,049	0,001
EHT23	0,061	0,003
EHT24	0,047	0,000
EHT25	0,161	0,085

EHT26	0,152	0,078
EHT27	0,154	0,085
EHT28	0,156	0,134

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 33. GP_x aktivitesi

3.4.4.8. Diagnostik Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

3.4.4.8.1. Kan Serum Aminotransferazların Aktiviteleri: (AST ve ALT)

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi (Tablo 34, Şekil 34, 35).

Tablo 32. AST-ALT aktiviteleri

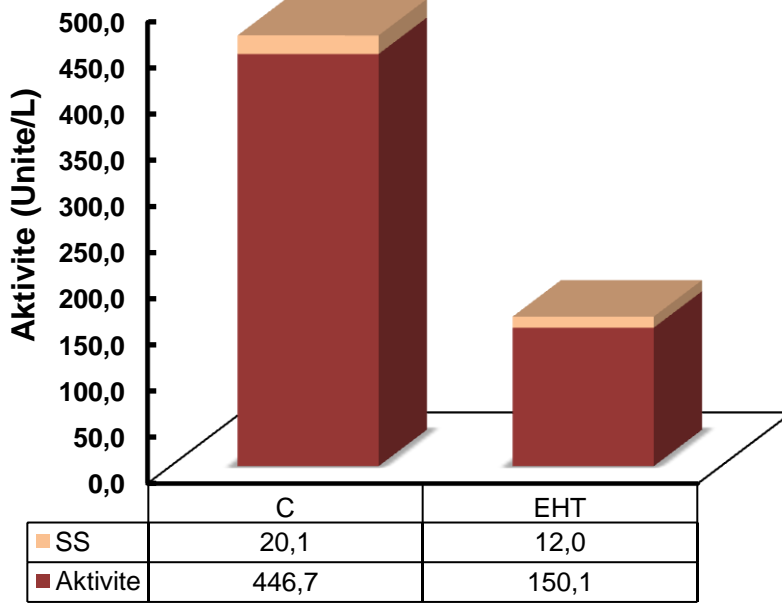
Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Unite/L)	
	AST (Ortalama)	ALT (Ortalama)
C1	134	63

C2	74	63
C3	113	84
C4	136	103
C5	614	551
C6	713	701
C7	1873	1658
C8	1532	2443
C9	189	128
C10	100	74
C11	198	57
C12	204	87
C13	167	35
C14	198	103
C15	138	552
EHT1	133	58
EHT2	124	232
EHT3	145	544
EHT4	256	232
EHT5	205	266
EHT6	299	129
EHT7	5	136
EHT8	285	129
EHT9	207	45
EHT10	204	67
EHT11	330	65
EHT12	72	48
EHT13	100	101
EHT14	1114	24
EHT15	326	22
EHT16	445	515
EHT17	103	665
EHT18	130	126
EHT19	71	22
EHT20	176	43
EHT21	104	31
EHT22	106	64
EHT23	127	24
EHT24	261	77
EHT25	74	44

EHT26	35	239
EHT27	66	139
EHT28	322	120

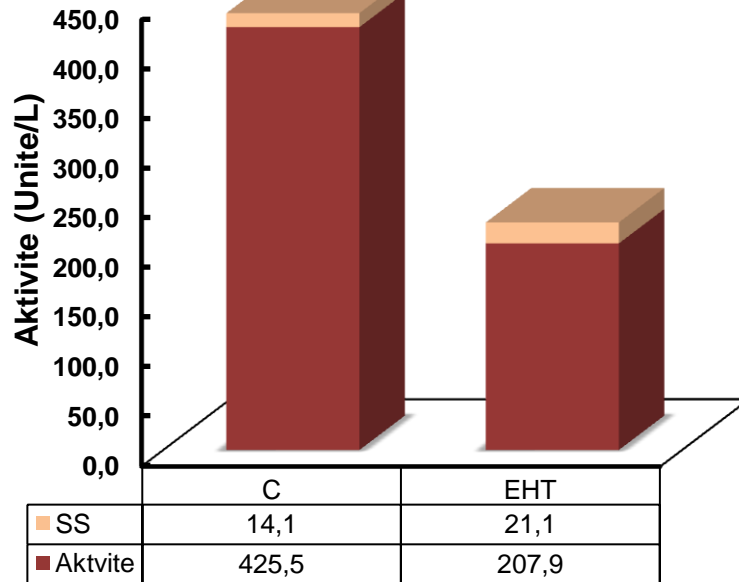
Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

ALT



Şekil 15. ALT aktivitesi

AST



Şekil 35. AST aktivitesi

3.4.4.8.2. Kan Serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesi

LDH ölçümü Kubowitz ve Ott (1943) tarafından tanımlanmış metodunun Wroblewski ve LaDue (1955) tarafından optimize edilmiş olan spektrofotometrik metot ile tayin edildi. (Tablo 35, Şekil 36)

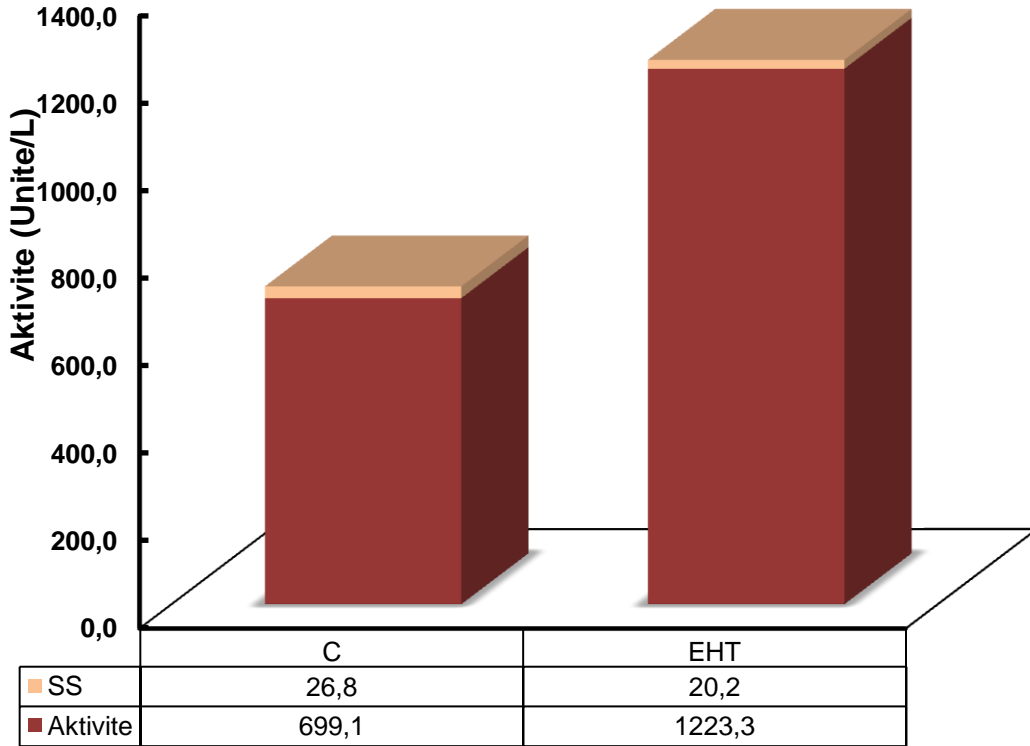
Tablo 33. LDH aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Unite/L)	
	Ortalama	SS
C1	387,0	9,9
C2	510,0	14,1
C3	650,0	212,1
C4	1300,0	1,2
C5	300,0	22,3
C6	570,0	12,3
C7	1130,0	11,2
C8	2010,0	12,4
C9	340,0	16,3
C10	1130,0	12,9
C11	320,0	11,3
C12	450,0	15,7
C13	390,0	16,3
C14	470,0	19,5
C15	530,0	14,5
EHT1	374,0	31,1
EHT2	1575,0	35,4
EHT3	345,0	6,3
EHT4	407,0	7,1
EHT5	1010,0	5,7
EHT6	3096,0	67,9
EHT7	1526,0	11,3
EHT8	636,0	11,3
EHT9	1950,0	39,6
EHT10	370,0	14,1
EHT11	453,0	7,1
EHT12	4900,0	141,4
EHT13	5320,0	19,3
EHT14	3215,0	22,6
EHT15	433,0	18,4
EHT16	447,0	7,1

EHT17	272,0	2,8
EHT18	534,0	3,4
EHT19	294,0	8,5
EHT20	2172,0	24,5
EHT21	104,0	8,5
EHT22	1718,0	25,5
EHT23	456,0	10,2
EHT24	589,0	12,3
EHT25	782,0	1,6
EHT26	453,0	14,3
EHT27	389,0	1,9
EHT28	432,0	7,4

Her bir değer, her biri en az üç tekrarlı olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

LDH



Şekil 36. LDH aktivitesi

Tüylü yakıotu ekstresinin sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri genel derleme olarak aşağıdaki Tablo 36'da verilmektedir.

Tablo 34. Tüylü yakıotunun sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzim aktivitesi üzerine genel bir derleme.

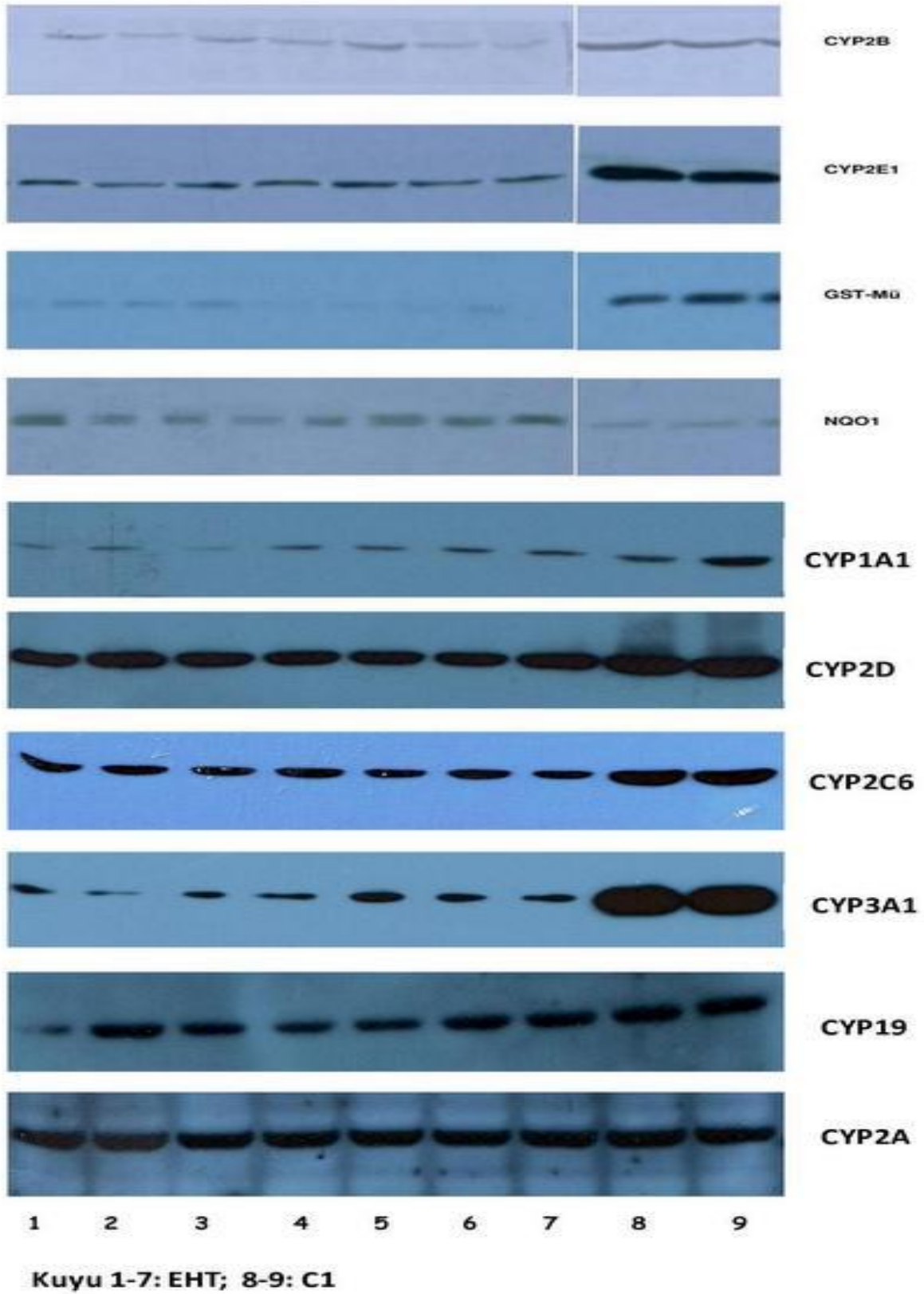
Enzim Aktivitesi	Kontrol (Ortalama ± Standart Sapma)	Yakıotu Ekstresi Uygulanmış (EHT) (Ortalama ± Standart Sapma)
Anilin 4-Hidroksilaz (nmol/dak/mg protein)	0,432 ± 0,011	0,118 ± 0,007 *
Aromataz (pmol/dak/mg protein)	6,52 ± 0,87	5,60 ± 0,77
Aminopiren (nmol/dak/mg protein)	0,242 ± 0,084	0,229 ± 0,077
Benzfetamin (nmol/dak/mg protein)	1,356 ± 0,090	0,681 ± 0,108 *
Eritromisin N-Demetilaz (nmol/dak/mg protein)	0,238 ± 0,020	0,127 ± 0,025*
Etilmorfin N-Demetilaz (pmol/dak/mg protein)	1,891 ± 0,059	0,313 ± 0,044 *
Kafein (pmol/dak/mg protein)	0,582 ± 0,044	0,403 ± 0,031 *
NDMA (pmol/dak/mg protein)	0,227 ± 0,020	0,168 ± 0,016
BROD (pmol/dak/mg protein)	3,34 ± 0,070	1,91 ± 0,040 *
EROD (pmol/dak/mg protein)	6,91 ± 2,65	4,47 ± 1,55
MROD (pmol/dak/mg protein)	7,96 ± 0,42	5,73 ± 0,49
PROD (pmol/dak/mg protein)	5,60 ± 1,86	6,20 ± 1,57
NQO1 (pmol/dak/mg protein)	175,77 ± 7,94	472,54 ± 11,88 *
GST-EA	3,72 ± 0,01	6,70 ± 0,06

(nmol/dak/mg protein)		
GST-CDNB (nmol/dak/mg protein)	705,51 ± 38,46	379,56 ± 21,39 *
GST-DCNB (nmol/dak/mg protein)	14,20 ± 6,46	8,17 ± 3,37 *
GST-EPNP (µmol/dak/mg protein)	28,37 ± 1,72	17,17 ± 1,67
SOD (U/dak/mg protein)	2,12 ± 0,17	2,97 ± 0,090
Katalaz (mmol/dak/mg protein)	0,252 ± 0,058	0,144 ± 0,013
GPx (nmol/dak/mg protein)	0,074 ± 0,0019	0,1065 ± 0,0158 *
AST (Ünite/L)	425,5 ± 14,1	207,9 ± 21,1
ALT (Ünite/L)	446,7 ± 20,1	150,1 ± 12 *

3.5. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

3.5.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Tüylü yakıotunun sıçan karaciğer enzimleri üzerine olan etkileri western blot ile gerçekleştirildi. Örneklerden elde edilen blot görüntüleri aşağıdaki Şekil 37'de verilmektedir. Tüm örneklerin görüntü analizleri Scion Image (Versiyon Beta, 4.0.2) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar aşağıdaki Tablo 37'de sunulmaktadır.



Şekil 167. Tüylü yakıtının sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzimler üzerindeki etkilerinin western blot görüntüleri.

Tablo 35. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler

İzozim	Kontrol* (Ortalama±Standart Sapma)	EHT* (Ortalama±Standart Sapma)	Kontrole göre % Oran
CYP1A1	1.507 ± 739	442 ± 211	29
CYP3A1	5.823 ± 77	893 ± 323	15
CYP2D	5.045 ± 149	3.880 ± 471	77
CYP2A3	2.074 ± 249	1.844 ± 249	89
CYP19	2.624 ± 55	1.796 ± 586	68
CYP2C6	2.622 ± 207	3.108 ± 202	119
CYP2E1	1.890 ± 330	1.300 ± 360	69
CYP2B1	4.286 ± 769	2.909 ± 885	67
GST-Mu	5.981 ± 1.149	333 ± 78	5.6
NQO1	6.653 ±2.438	11.636 ± 3478	174

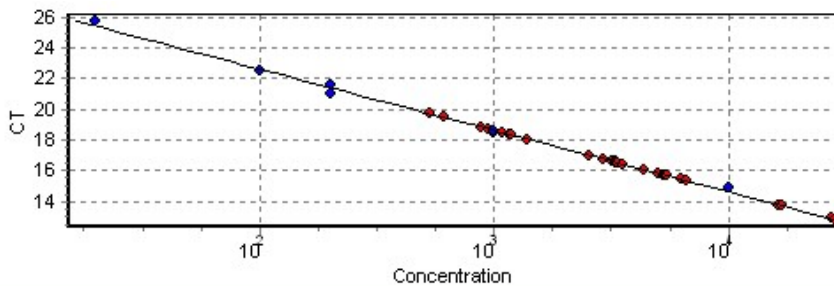
*Sadece resmedilen değil tüm kontrol ve EHT örneklerin ortalama değerleridir.

3.5.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

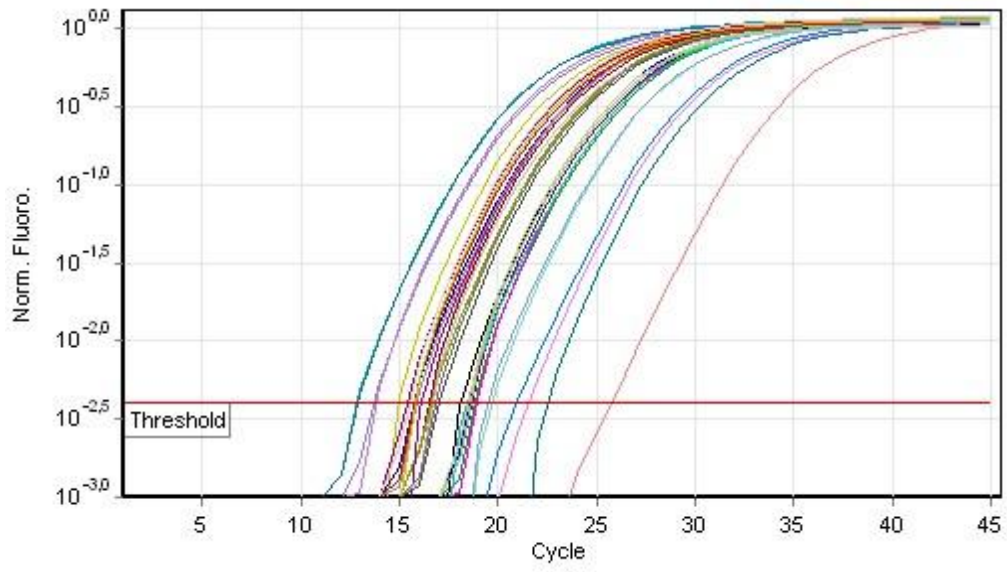
Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi öncelikle çalışılan her bir gen için amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Daha sonra bu değerler kullanılarak her bir enzim için mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol ve EHT örneklerinde saptandı (Şekil 38-49).

Çalışılan ve aşağıda sonuçları verilen bütün genler için bu eğriler ayrı ayrı oluşturuldu fakat sadece CYP1A1 için oluşturulan eğriler örnek olarak verilmektedir.

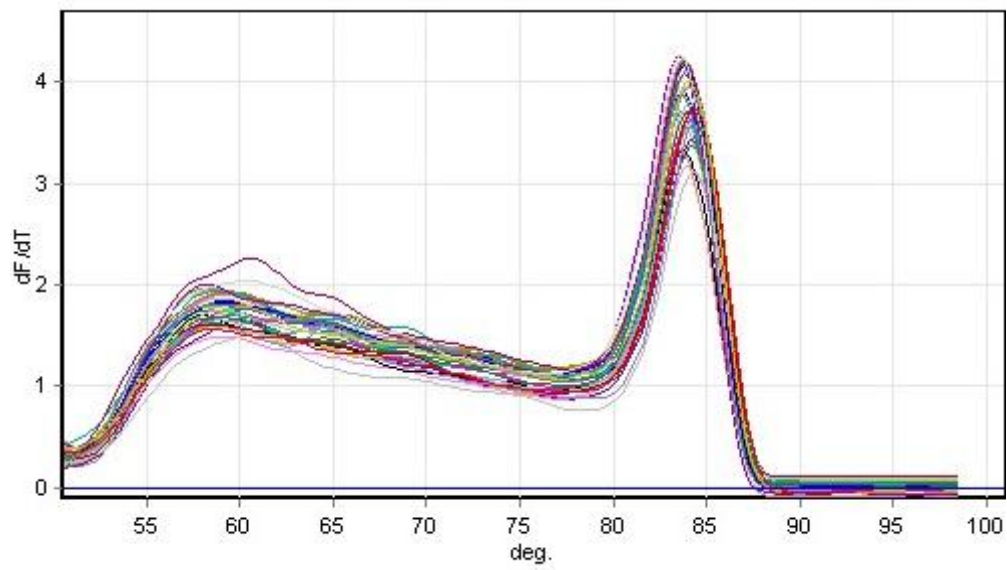
CYP1A1 qRT-PCR EĞRİLERİ: Standart Eğri



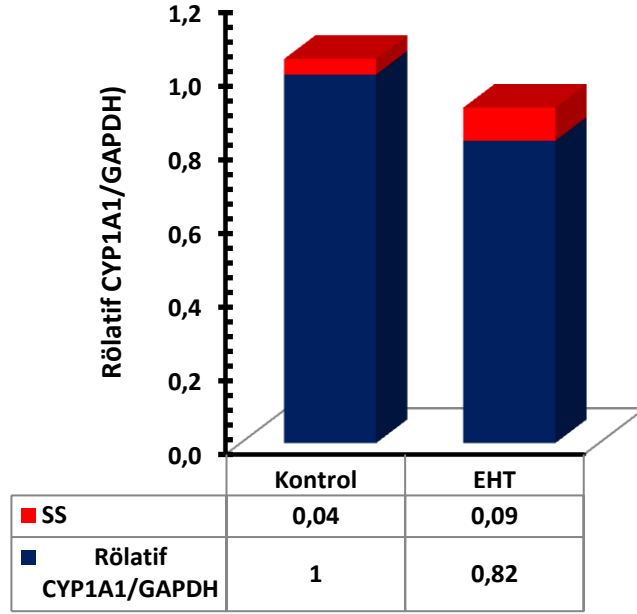
Standart eğri analizi için kullanılan kantitasyon eğrisi aşağıda verilmektedir.



CYP1A1 Erime Eğrisi:

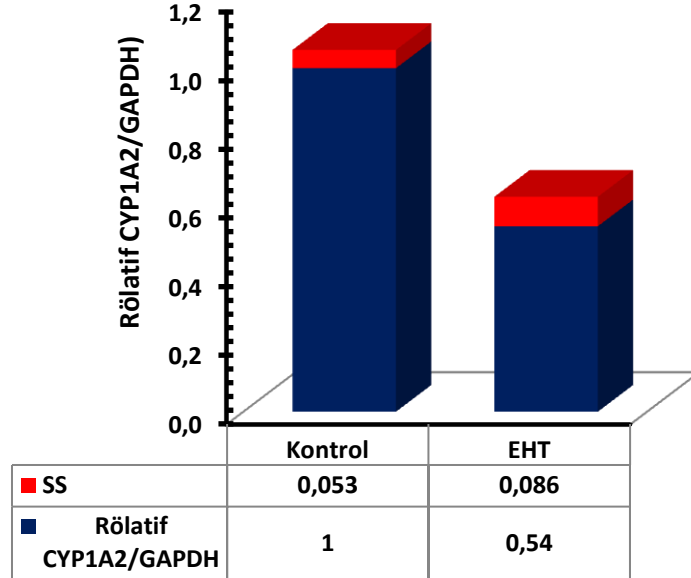


CYP1A1 [mRNA]



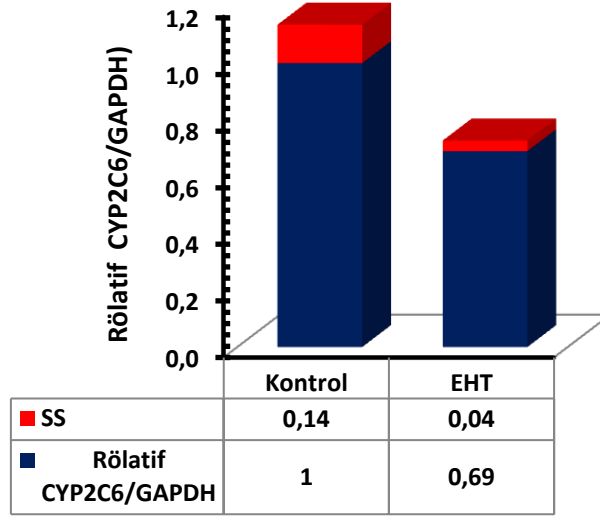
Şekil 38. CYP1A1 mRNA

CYP1A2 [mRNA]



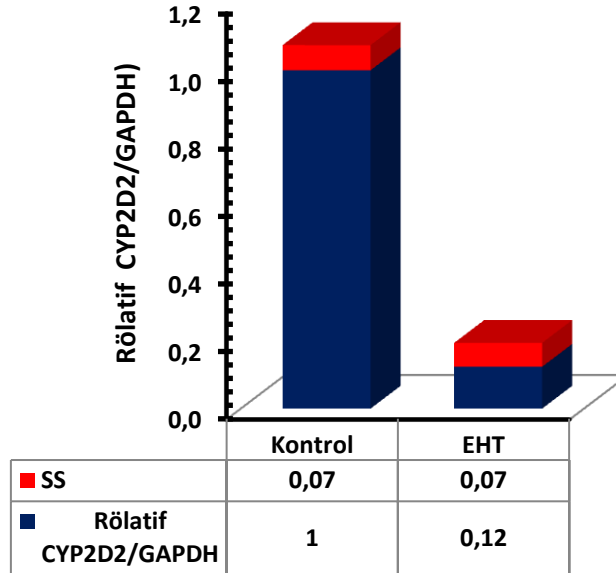
Şekil 17. CYP1A2 mRNA

CYP2C6 [mRNA]



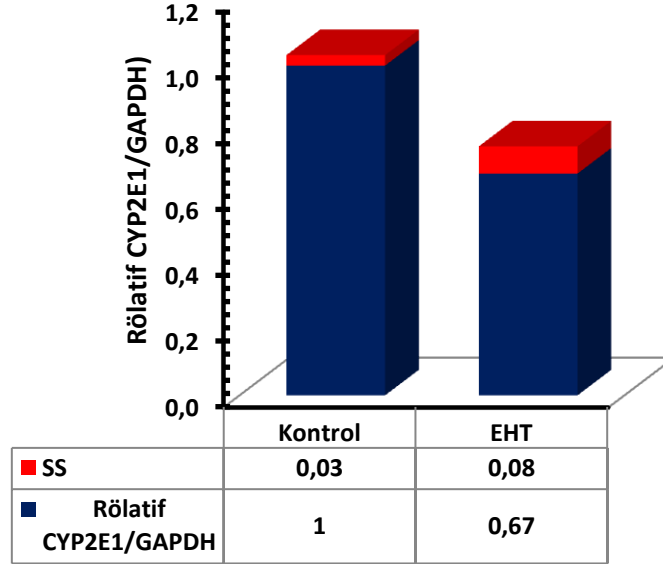
Şekil 40. CYP2C6 mRNA

CYP2D2 [mRNA]



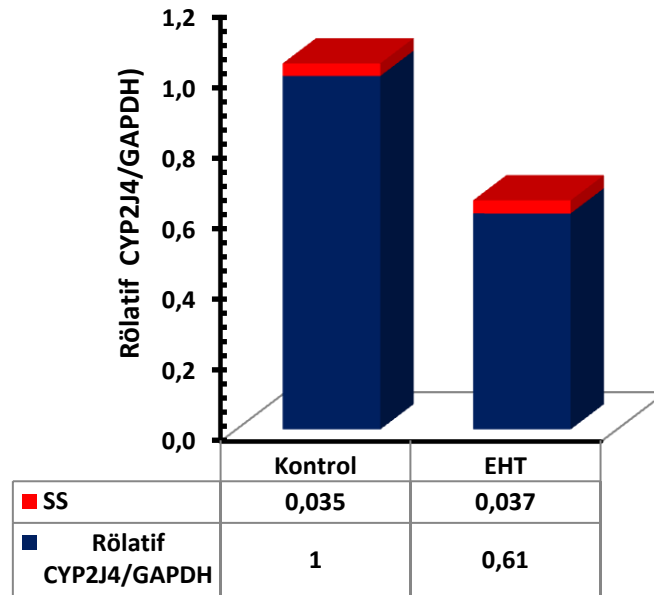
Şekil 41. CYP2D mRNA

CYP2E1 [mRNA]



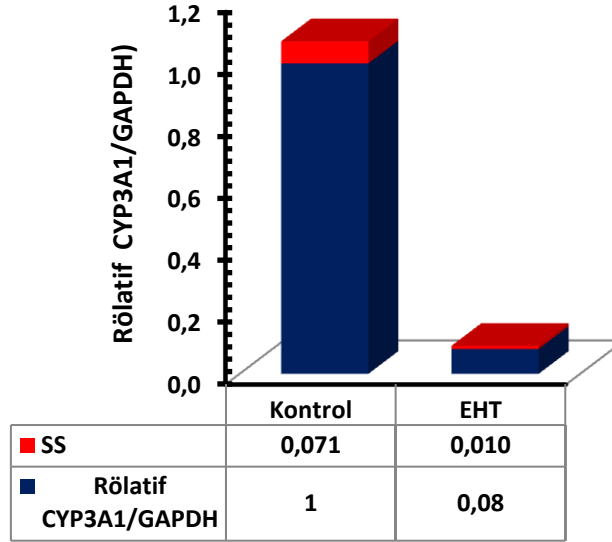
Şekil 18. CYP2E1 mRNA

CYP2J4 [mRNA]



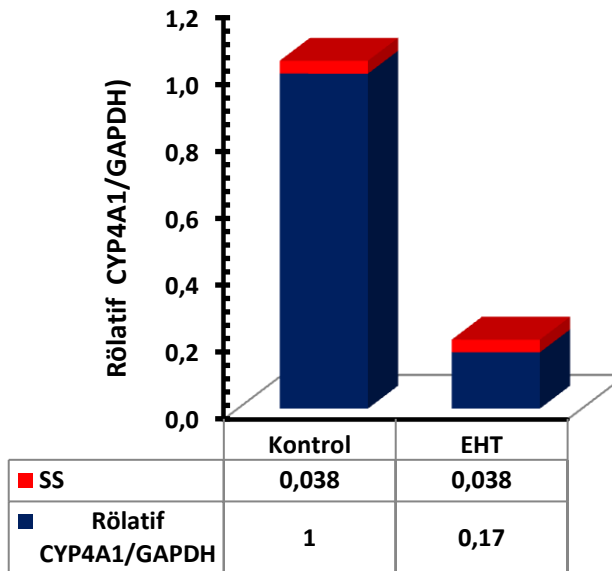
Şekil 19. CYP2J4 mRNA

CYP3A1 [mRNA]



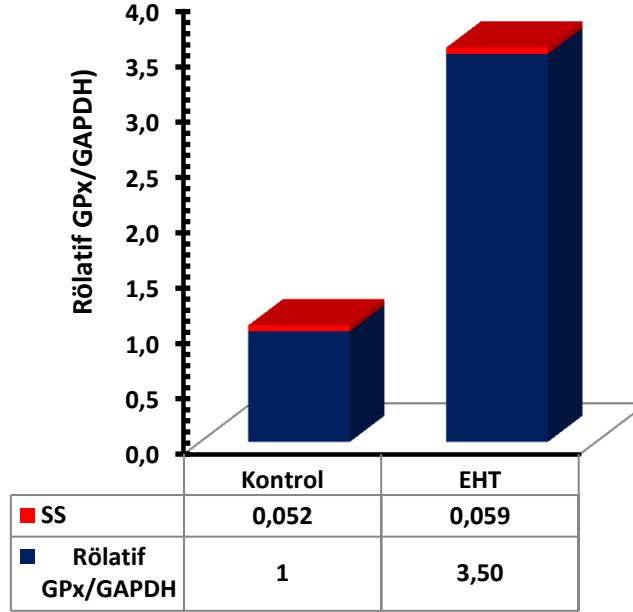
Şekil 20. CYP3A4 mRNA

CYP4A1 [mRNA]



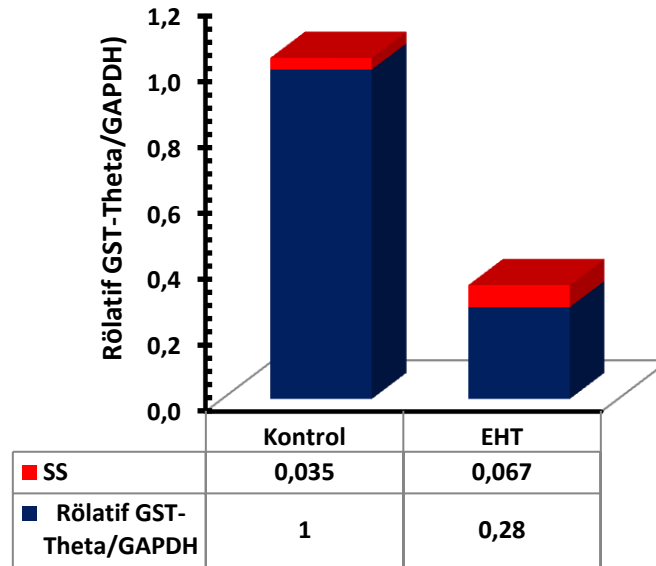
Şekil 21. CYP4A mRNA

GPx [mRNA]



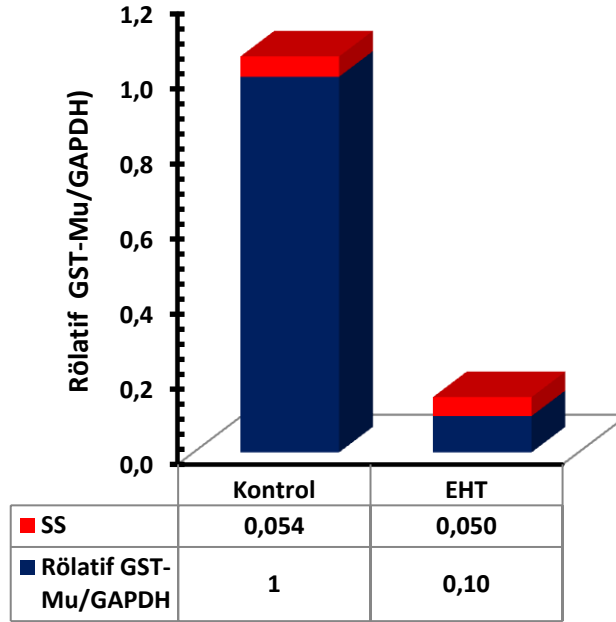
Şekil 22. GPX mRNA

GST-Theta [mRNA]



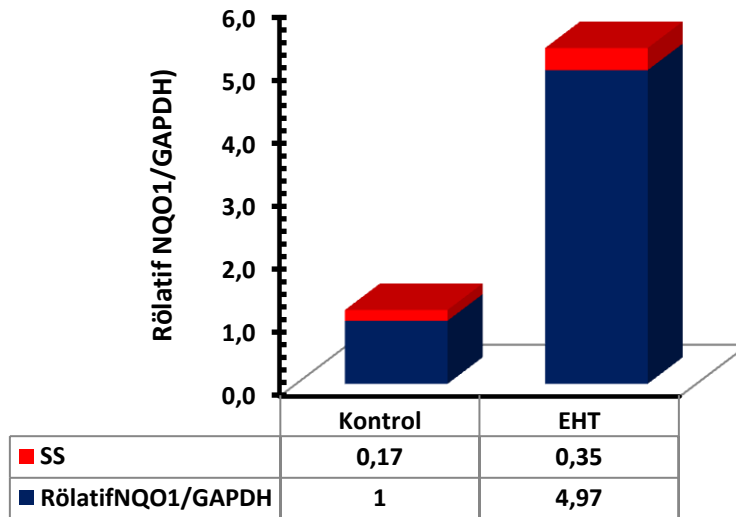
Şekil 23. GST-Tetha mRNA

GST-Mu [mRNA]



Şekil 24. GST-Mu mRNA

NQO1 [mRNA]



Şekil 49. NQO1 mRNA

mRNA ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 38'de toplu halde verilmektedir.

Tablo 36. mRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen değerler

Enzim	Kontrol	EHT (Ortalama \pm)	Kontrole göre
CYP1A1	1 \pm 0.04	0.82 \pm 0.09	1.22X azalma
CYP1A2	1 \pm 0.05	0.54 \pm 0.09	1.85X azalma
CYP2C6	1 \pm 0.14	0.69 \pm 0.04	1.45X azalma
CYP2D2	1 \pm 0.07	0.12 \pm 0.07	8.33X azalma
CYP2J4	1 \pm 0.04	0.61 \pm 0.04	1.64X azalma
CYP2E1	1 \pm 0.03	0.67 \pm 0.08	1.49X azalma
CYP3A1	1 \pm 0.07	0.08 \pm 0.01	12.5X azalma
CYP4A1	1 \pm 0.04	0.17 \pm 0.04	5.88X azalma
GPx	1 \pm 0.05	3.50 \pm 0.06	3.50X artma
GST-Theta	1 \pm 0.04	0.28 \pm 0.07	3.57X azalma
GST-Mu	1 \pm 0.05	0.10 \pm 0.05	10.0X azalma
NQO1	1 \pm 0.17	4.97 \pm 0.35	4.97X artma

3.6. Tüylü Yakı otu Ekstresinin Hücre Kültürlerine Uygulanması

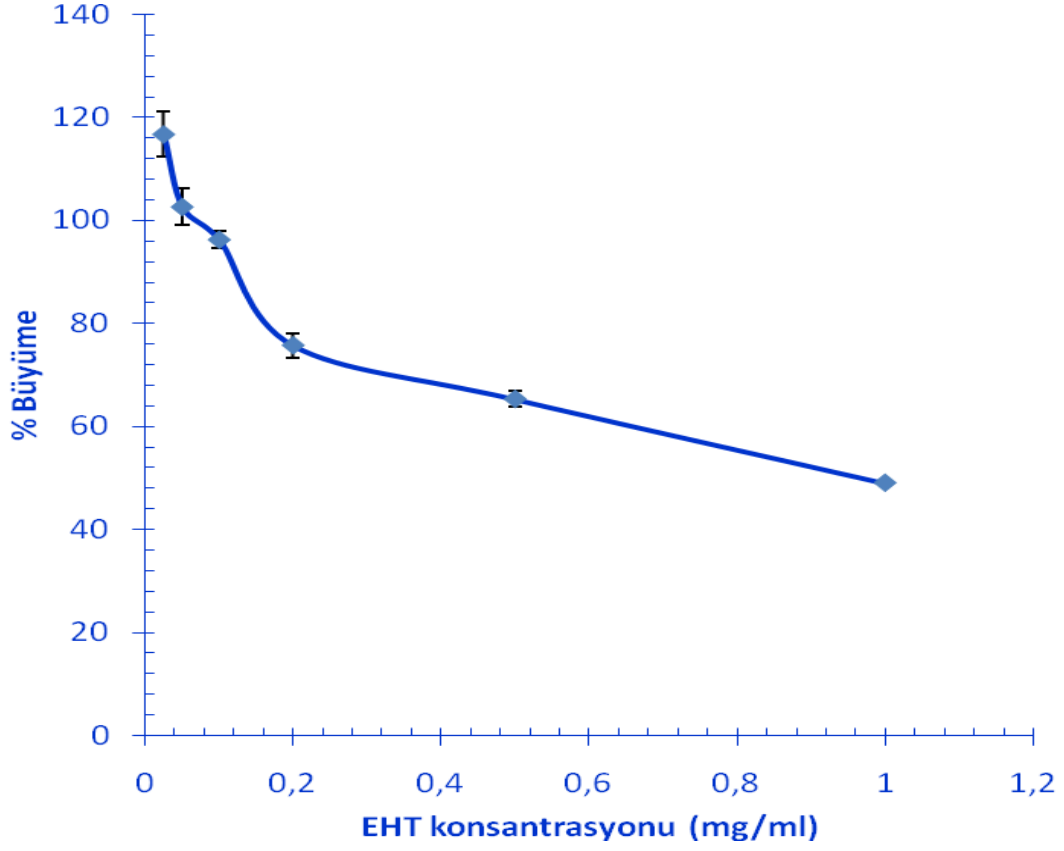
Tüylü yakıotunun değişik hücre hatlarında gösterdiği sitotoksik etkiler aşağıdaki Şekil 50-53 ve Tablo 39-42'de verilmektedir.

3.6.1. Tüylü Yakı otunun Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkileri

3.6.1.1. İnsan Embriyonik Böbrek 293 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisi

Tablo 37. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

Yakıotu	Ortalama	Ortalama	Standart
0,025	0,866	116,672	0,033
0,05	0,761	102,571	0,026
0,1	0,714	96,194	0,012
0,2	0,562	75,671	0,017
0,5	0,484	65,252	0,011
1	0,363	48,950	0,002

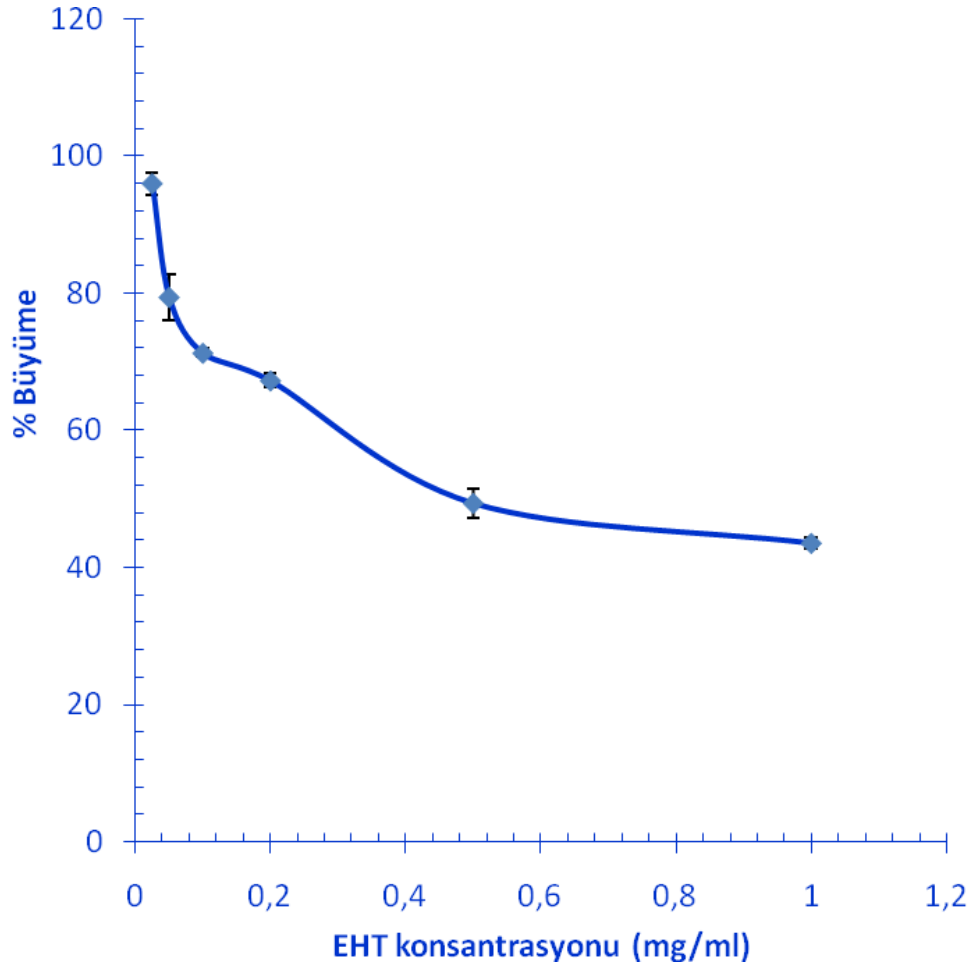


Şekil 25. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

3.6.2. İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Tablo 38. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

Yakıotu	Ortalama	Ortalama	Standart
0,025	0,428	95,95	1,62
0,05	0,354	79,37	3,39
0,1	0,318	71,23	0,59
0,2	0,300	67,20	0,98
0,5	0,220	49,35	2,12
1	0,194	43,53	0,85

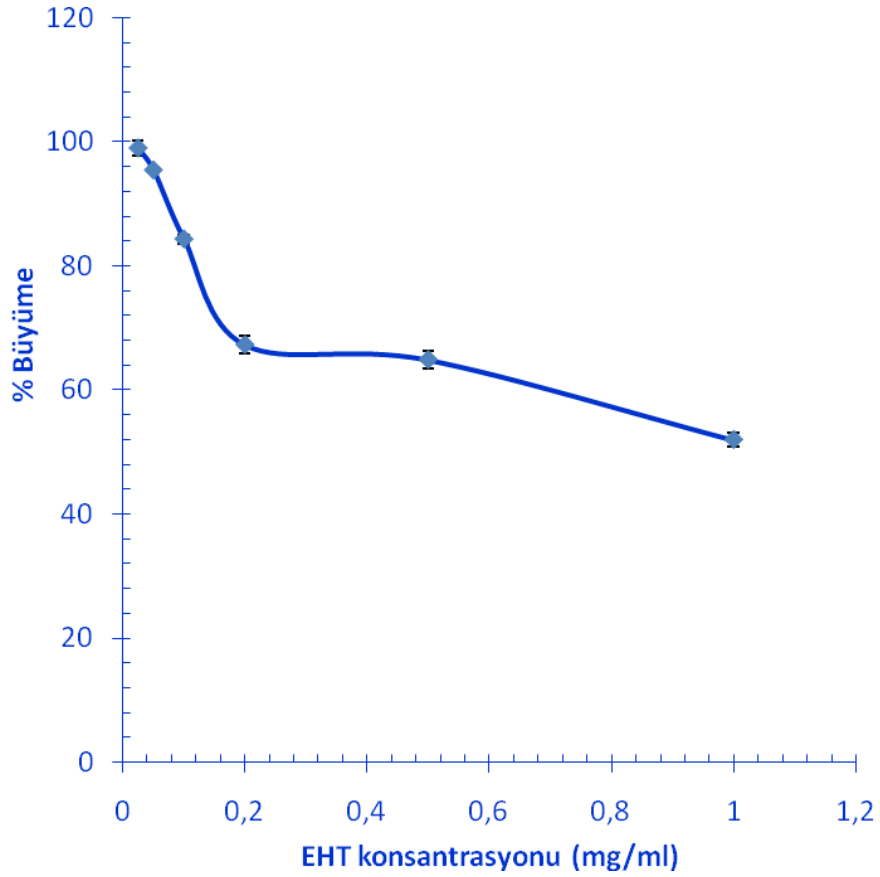


Şekil 26. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

3.6.3. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Tablo 39. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

Yakıotu	Ortalama	Ortalama	Standart
0,025	0,726	98,87	1,19
0,05	0,700	95,33	0,34
0,1	0,619	84,22	0,69
0,2	0,494	67,20	1,39
0,5	0,476	64,80	1,38
1	0,381	51,91	1,02

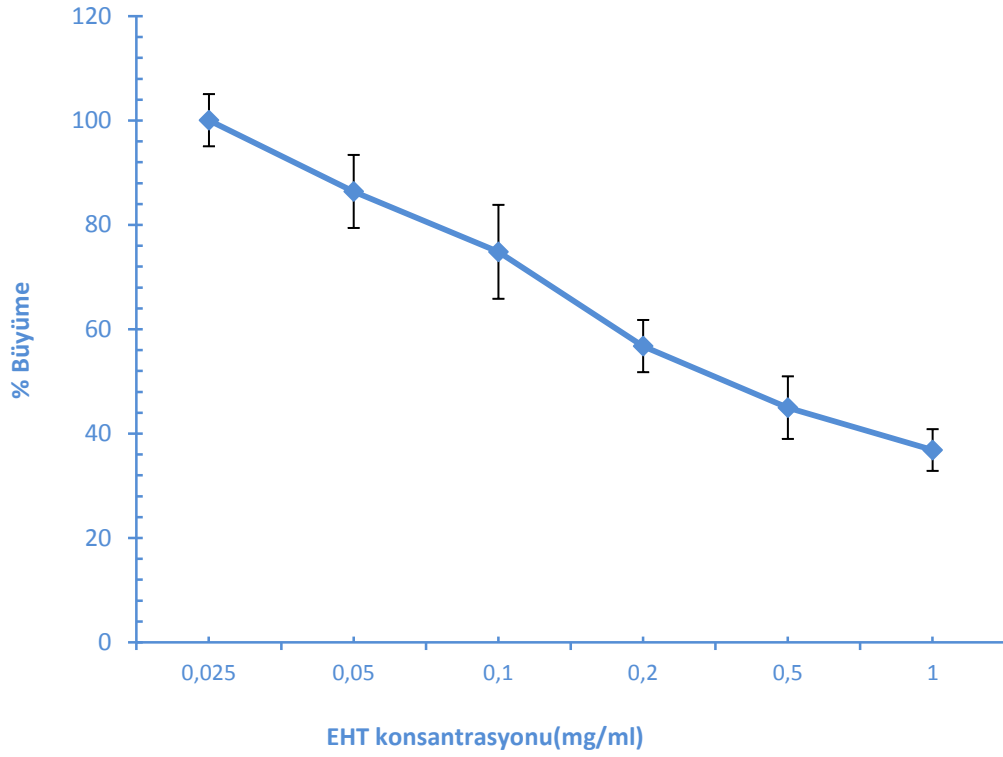


Şekil 27. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücreleri üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

3.6.4. İnsan Embriyonik Fibroblast 3T3 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisi

Tablo 40. İnsan Embriyonik Fibroblast hücre hattı üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

Yakıotu	Ortalama	Ortalama	Standart
0,025	0,735	100,053	0,0052
0,05	0,634	86,394	0,0076
0,1	0,549	74,824	0,0090
0,2	0,417	56,764	0,0055
0,5	0,330	44,967	0,0065
1	0,270	36,844	0,0237

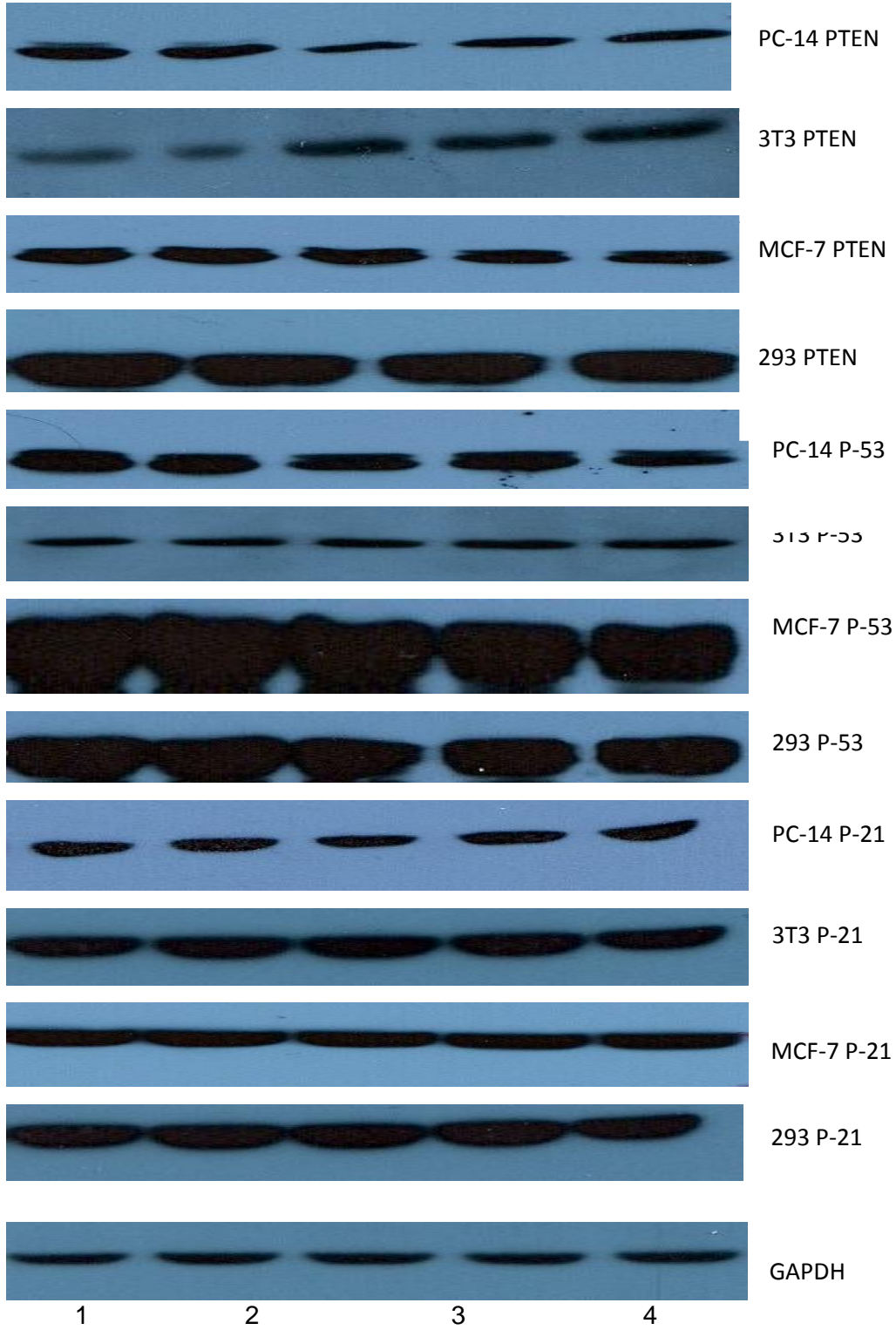


Şekil 28. İnsan Embriyonik Fibroblast hücre hattı üzerinde EHT'nin sitotoksik etkisi

3.6.2. Tüylü Yakıotu Ekstresinin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi

Hücre kültüründe standardizasyon çalışmaları optimize edilmiş ve p53, p21 ve PTEN geni ile ilgili tanımlamalar yapılmış, iç standart olarak da GAPDH geni kullanılmıştır. Elde edilen western blot görüntüleri aşağıdaki şekilde (Şekil 54) ve tüm örneklerin Scion Image (Version Beta, 4.0.2) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen görüntü analiz sonuçları Tablo 43'te sunulmaktadır.

Şekil 29. Hücre kültürü Western Blot görüntüleri



Kuyu 1-2: Kontrol-C; Kuyu 3-5: EHT ile muamele edilmiş hücre hatları

Tablo 41. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler

İzozim	Hücre Hattı	Kontrol* (Ortalama±SS)	EHT* (Ortalama±SS)	Kontrole göre % oran
P-53	3T3	3264±183,8	3496±94,8	Değişim yok
	MCF-7	7405,5±427,7	7293,5±229,8	Değişim yok
	293	5716±115,9	5055,5±103,9	-12%
	PC-14	4671±717	4415±166,9	Değişim yok
PTEN	3T3	1279±439,8	2864,5±132,2	114%
	MCF-7	4425±258,8	4168±661,9	Değişim yok
	293	5804±55,2	5376,5±78,5	Değişim yok
	PC-14	2750,5±14,8	1860±366,9	-27%
P-21	3T3	4469,3±263,2	5105,5±310,4	14%
	MCF-7	5576±374,8	5429±286,4	Değişim yok
	293	4448,5±186	4674,3±121,6	Değişim yok
	PC-14	2827±76,4	2841,7±314	Değişim yok

*Sadece resmedilen değil tüm örneklerin ortalama değerleridir

3.7. Ekstrenin Karaciğer Tüm Doku Protein Profillerine (PROTEOM) Etkilerinin Saptanması

Yukarıda metot kısmında belirtilen yöntemlerle tespit edilen protein spotları jelden manuel olarak kesilerek Proteome Factory AG şirketine (Dorotheenstr. 94, D-10117 Berlin-ALMANYA) gönderilmiştir ve firmadan gelen analiz sonuçları aşağıda verilmiştir.

Proteom Sonuçları:

Kontrol 2DE Jelinden alınan spotlar: 1-12 ve 13-24

Epilobium Hirsutum (Yakıotu, EHT) 2DE Jelinden alınan spotlar: 25-52

Protein identification report

1 Sample#1 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial (Fragment) OS=Rattus norvegicus

GN=Bckdha PE=1 SV=1

- 2 Sample#2 Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pebp1 PE=1 SV=3
 - 3 Sample#3 Peroxiredoxin-2 OS=Mus musculus GN=Prdx2 PE=1 SV=3
 - 4 Sample#4 Actin, gamma OS=Cephalosporium acremonium GN=ACT PE=3 SV=1
 - 5 Sample#5 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
 - 6 Sample#6 Arginase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Arg1 PE=1 SV=2
 - 7 Sample#7 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
 - 8 Sample#8 Endoplasmin OS=Mus musculus GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2
 - 9 Sample#9 Endoplasmin OS=Canis familiaris GN=HSP90B1 PE=1 SV=1
 - 10 Sample#10 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
 - 11 Sample#11 Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6 PE=1 SV=2
 - 12 Sample#12 Tubulin beta chain OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
 - 13 Sample#25 Arginase-1 OS=Rattus norvegicus GN=Arg1 PE=1 SV=2
 - 14 Sample#26 Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
 - 15 Sample#27 Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Microtus ochrogaster GN=IDH1 PE=3 SV=1
 - 16 Sample#28 Fumarylacetoacetase OS=Rattus norvegicus GN=Fah PE=1 SV=1
- file:///D:/PFA/110304A_Adali_Sample_01-12+25-32.htm[08.04.2011 14:29:59]
- 17 Sample#29 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Rattus norvegicus GN=Hpd PE=1 SV=3
 - 18 Sample#30 Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
 - 19 Sample#31 Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
 - 20 Sample#32 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Mesocricetus auratus GN=ALDH2 PE=1 SV=1

B1 Sample 13 isovaleryl-KoA dehydrogenase, mitochondrial precursor [Rattus norvegicus]

B2 Sample 14 cytokeratin 8 polypeptide [Rattus norvegicus]

B3 Sample 15 serum albumin precursor [Rattus norvegicus]

B4 Sample 16 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B5 Sample 17 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B6 Sample 18 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor Peroxiredoxin-6

B7 Sample 19 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B8 Sample 20 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B9 Sample 21 No significant result

B10 Sample 22 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B11 Sample 23 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B12 Sample 24 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

C9 Sample 33 No significant result

C10 Sample 34 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

C11 Sample 35 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

C12 Sample 36 RecName: Full=Protein disulfide-isomerase; Short=PDI; AltName: Full=Cellular thyroid hormone-binding protein; AltName: Full=Prolyl 4-hydroxylase subunit
beta; Flags: Precursor

D1 (59) Sample 37 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D2 (60) Sample 38 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D3 (61) Sample 39 keratin 1

D4 (62) Sample 40 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor calreticulin precursor

D5 (63) Sample 41 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor Enoil-KoA hydratase, mitochondrial precursor

D6 (64) Sample 42 keratin 1

D7 (65) Sample 43 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D8 (66) Sample 44 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D9 (67) Sample 45 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D10 (68) Sample 46 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D11 (69) Sample 47 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D12 (70) Sample 48 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase [Rattus norvegicus]

E1 (71) Sample 49 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

E2 (72) Sample 50 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

E3 (73) Sample 51 vitellogenin-2 precursor [Gallus gallus]

E4 (74) Sample 52 RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B9-2 (75) Sample 33, reanalysed RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA;

AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor

B10-2 (76) Sample 34, reanalysed RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

B11-2 (78) Sample 35, reanalysed RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D7-2 (77) Sample 43, reanalysed RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

D10-2 (80) Sample 46, reanalysed calreticulin precursor

D11-2 (79) Sample 47, reanalysed immunoglobulin heavy chain variable region

D12-2 (81) Sample 48, reanalysed 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase]

E1-2 (82) Sample 49, reanalysed RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor

E2-2 (84) Sample 50, reanalysed No significant result

E4-2 (83) Sample 52, reanalysed No significant result

Tablo 44. Proteom sonuçlarına göre ekspresyonları değişen proteinler

NO	Protein Adı	Eşleşme	MA
1	2-oksoizovalerat dehidrogenaz alfa altünitesi	11	50133
2	Fosfotidiletanolamin bağlayıcı protein	13	20788
3	Peroksiredoksin-2	5	21765
4	Arjinaz-1	24	34951
5	Glukoz-düzenleyici protein 78	51	72288
6	Endoplazmin (OS= <i>Mus musculus</i>)	11	92418
7	Endoplazmin (OS= <i>Canis familiaris</i>)	9	92456
8	Protein disulfid-izomeraz A6	24	48143
9	İzositrat dehidrogenaz [NADP] sitoplazmik	6	46665
10	Fumarilasetoasetaz	4	45946
11	4- hidroksifenilpiruvatdioksijenaz	11	45084
12	Aldehit dehidrogenaz, mitokondriyal	28	54299
13	İzovaleril-KoA dehidrogenaz, mitokondriyal	6	46406
14	Peroksiredoksin-6	2	24855
15	Protein disulfid-izomeraz	18	56916
16	Kalretikülin	4	47966
17	Enoil-KoA hidrataz, mitokondriyal	2	28269
18	3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	6	32561
19	vitelojenin-2	14	204679

4. TARTIŞMA

Elde edilen bulgular aşağıda maddeler şeklinde özetlenebilir:

1. Tüylü yakıotu (*Epilobium hirsutum* – EHT) muamelesi tüm hayvanlarda bir miktar kilo kaybına neden oldu.
2. Kontrol ve muamele yapılan iki grup hayvan doku ağırlıkları arasında ciddi bir fark oluşmadı.
3. Kontrol ve yakıotu verilmiş hayvanların ortalama Transaminaz (ALT ve AST) değerleri arasında önemli farklılıklar gözlemlendi.
4. Yakıotu muamelesi sonrasında enzim aktiviteleri gözlenen değişimler doğrultusunda aşağıdaki gibi 3 gruba ayrılabilir.
 - a. Değişim göstermeyen grup: DELTA SIFIR GRUP
 - i. CYP2C tarafından katalize edilen APND aktivitesi
 - ii. CYP2B tarafından katalize edilen PROD aktivitesi
 - b. Azalma Gösteren Grup: DELTA EKŞİ GRUP
 - i. CYP2E1 tarafından katalize edilen A4H aktivitesi – 3.63 kat azalma
 - ii. Yine CYP2E1 tarafından katalize edilen NDMA aktivitesi – 1.35 kat azalma
 - iii. CYP2B tarafından katalize edilen BND aktivitesi - yaklaşık 2 kat azalma
 - iv. Yine CYP2B tarafından katalize edilen EMND aktivitesi - yaklaşık 6 kat azalma
 - v. Yine CYP2B tarafından katalize edilen BROD aktivitesi – 1.74 kat azalma
 - vi. CYP3A tarafından katalize edilen ERND aktivitesi - yaklaşık 2 kat azalma
 - vii. CYP1A izozimleri tarafından katalize edilen C3ND aktivitesi – 1.44 kat azalma
 - viii. Yine CYP1A izozimleri tarafından katalize edilen MROD aktivitesi – 1.38 kat azalma
 - ix. Yine CYP1A izozimleri tarafından katalize edilen EROD aktivitesi - yaklaşık 1.54 kat azalma

- x. Total GST aktivitesi (GST-CDNB) – 1.85 kat azalma
- xi. GST- DCNB aktivitesi – 1.73 kat azalma
- xii. GST-EPNP aktivitesi - 1.65 kat azalma
- xiii. CAT aktivitesi – 1.75 kat azalma
- xiiii. CYP19 tarafından katalize edilen aromataz aktivitesi - 1.16 kat azalma

c. Artış Gösteren Grup: DELTA ARTI GRUP

- i. NQO1 aktivitesi - yaklaşık 2,68 kat artış
- ii. GST-EA aktivitesi – 1.80 kat artış
- iii. GPx aktivitesi – 1.43 kat artış
- iv. SOD aktivitesi- 1.40 kat artış

5. Yakıotu (EHT) muamelesi sonrasında Sitokrom P450 izozimlerinin ve diğer enzimlerin protein ekspresyon düzeylerindeki değişimler aşağıdaki gibi olmuştur:

- a. CYP1A1 de 3.40 kat azalma
- b. CYP3A1 de 6.52 kat azalma
- c. CYP2D de 1.30 kat azalma
- d. CYP2A da 1.12 kat azalma
- e. CYP19 de 1.49 kat azalma
- f. CYP2E1 de 1.45 kat azalma
- g. CYP2C6 da 1.18 kat artış (önemsiz)
- h. CYP2B de 1.47 kat azalma
- ı. GST-Mü de 17.96 kat azalma
- i. NQO1 da 1.74 kat artış gözlemlendi.

6. Yakıotu (EHT) muamelesi sonrasında Sitokrom P450 izozimlerinin ve diğer enzimlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler aşağıdaki gibi olmuştur:

- a. CYP1A1 de 1.22 kat azalma
- b. CYP3A1 de 12,5 kat azalma

- c. CYP2D de 8.33 kat azalma
 - d. CYP2J de 1.64 kat azalma
 - e. CYP4A da 5.88 kat azalma
 - f. CYP2E1 de 1.49 kat azalma
 - g. CYP2C6 da 1.45 kat azalma
 - h. CYP1A2 de 1.85 kat azalma
 - ı. GST-Mü de 10 kat azalma
 - i. NQO1 da 4.97 kat artış
 - j. GST-Tetha da 3.57 kat azalma
 - k. GPX de 3.50 kat artış gözlemlendi.
- 7.** Çalışılan iki normal ve iki kanser hücre hattında yaklaşık 1 mg/ml'lik EHT konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlemlendi.
- a.** Sitotoksik etki gözlenen konsantrasyonda GAPDH geni düzey tayinleri gerçekleştirildi.
 - b.** p53, p21 ve PTEN geni ile yapılan çalışmalarda p53 ve p21 protein ekspresyon düzeyinde önemli değişiklikler gözlenmedi. PTEN, 3T3 insan fibroblastik hücreleri üzerinde protein ekspresyonunu artırırken, PC-14 insan akciğer hücreleri üzerinde protein ekspresyonunu azaltmaktadır.
- 8.** 2D-elektroforez sistemi laboratuvar koşullarımıza uygun hale getirildi. Proteinlerin analizi için yurtdışına gönderilen örneklerin sonuçları geldi. Tamamen yok olan ya da azalan 52 spot seçildi ve 19 spot tanımlandı.
- 9.** Enzim aktiviteleri ile enzim protein ekspresyon düzeyleri arasında (artış ve azalma düzeyleri arasında) önemli paralellik bulundu.
- 10.** Aynı izozim tarafından katalize edildiği bilinen (A4H ve NDMA gibi) değişik substratlar arasında artma ve azalma gibi genel değişkenlikte paralellik gözlenmesine rağmen artış yada azalma düzeyleri arasında farklılıklar gözlemlendi.

Bu veriler ışığında öncelikle tüylü yakıotu verilen hemen hemen tüm hayvanlarda (5 adedi hariç) hafif kilo kaybı gözlenmiş olması bu bitkiden elde

edilebilecek çayların düşük dozda ve devamlı tüketimi zayıflama aracı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Deneysel süreçte iki hayvanın ölüm nedeni yapılan incelemelerde ekstrenin toksik etkisinden değil, enjeksiyon işleminden kaynaklandığı saptandı.

Faz I, Faz II ve Antioksidan Enzimler ile İlgili Çalışma Sonuçları:

Transaminaz enzim düzeyindeki düşüşler genellikle önemsizdir. Bu enzimlerin düzeylerinde bir artış gözlenmemiş olması bu enzimlerin yaygın olarak buldukları özellikle eritrosit, kalp kası, karaciğer ve akciğer gibi dokularda herhangi bir doku harabiyeti olmadığı anlamına gelmektedir. Özellikle akut hepatik hasar göstergesi olan ALT de artış meydana gelmemiş olması nedeni ile kullanılan yakıotu dozlarının akut ya da kronik toksisite oluşturmadığını göstermektedir.

Antioksidan enzim (CAT, SOD ve GP_x) aktivite düzeylerindeki artış ve azalışlar iki şekilde değerlendirilebilir. İlki, CAT düzeyinde azalış gözlenmiş olması kullanılan dozlarda EHT'nin oksidatif stres oluşturmadığının göstergesi olabileceğidir. Diğeri, SOD ve GPX düzeyinde artış kullanılan dozlarda antioksidan etki göstermiş olabileceğinin göstergesidir. Bu gözlemler transaminazlarda bir artış gözlenmemiş olduğu dikkate alındığında, EH ekstresinin herhangi bir oksidan etki oluşturmadan antioksidan etki yarattığını daha da güçlü hale getirmektedir. Ayrıca GP_x'in mRNA düzeyindeki artışıda bu verileri doğrulamaktadır. Ayrıca, tüm bu veriler kullanılan dozların doğruluğunun bir göstergesi olarak ele alınabilir.

Tüylü yakıotu muamelesinin incelenen enzimlerin önemli bir bölümünde baskılama etkisi göstermiş olması bu bitkinin teraptik önemini vurgulamaktadır. Azalma görülen CYP1A grubunda yer alan C3ND, MROD ve EROD düzeylerinde gözlenen inhibisyon bu enzimlerin karsinojen metabolizmasında yer aldığı gerçeği göz önüne alındığında çok önem arz etmektedir. Böylelikle, benzopiren gibi diyetel yada çevresel maruz kalınan karsinojenlerin etkilerinin azaltılmasında önemli rol oynayacaktır. Bu enzim ile ilgili aktivitelerde, protein ve mRNA düzeylerinde tutarlı baskılanmalar bulunmuştur. Bu noktada, tüylü yakıotunun bu enzimlerin inhibitörlerini içerdiği yada bu enzimlerin supresyonunda rol oynayan glukokortikoid reseptörleri veya AhR reseptör ligandları içerdiği söylenebilir. Benzer olarak, alkol gibi düşük

moleküler ağırlıklı ajanların metabolizmasında yer alan ve oksidatif ajanların üretilmesinde rolü olan CYP2E1'e bağıl aktiviteler (A4H ve NDMA) ile CYP2E1 protein ve mRNA ekspresyonlarında gözlenen azalmada yine bu bitkinin etkisi olarak düşünülebilir. Bütün bunlar, tüylü yakıotunun antikarsinojen etkilere sahip olabileceğinin açıklaması olabilir.

Bununla birlikte, özellikle CYP1A2'nin bilinen ilaçların yaklaşık %10'unu katalize ettiği göz önüne alındığında özellikle bu bitkisel ürünlerin antidepresan grup ilaçlar ile birlikte alınmasının önemli ilaç etkileşimlerine yol açarak doz aşımalarına ve tehlikeli durumlara neden olabileceği de aşıkardır. Benzer olarak, karaciğerde en fazla bulunan sitokrom P450 olan CYP3A'nın ve bağıl enzim aktivitesinde, (ERND) protein ve mRNA düzeyinde gözlenen azalma yine birçok ilaç metabolizması ile negatif veya pozitif olarak etkileşim gösterecektir. Çünkü bu enzim günümüzde bilenen terapötik etmenlerin yaklaşık yarısının metabolizmasında yer almaktadır. Bunun yanı sıra, özellikle antineoplastik ilaçların metabolizmasında yer alan CYB2B enzimine bağıl aktivitelerin (BND, EMND, BROD) baskılanmış olması, bu bitkinin tedavi amaçlı olarak kanser tedavisinde destekleyici ve koruyucu etmen olarak kullanılması bu ilaçların yan etkilerinin abartılı seyretmesine neden olabilir. Tüm bu sonuçlar, bu bitkinin tüm bitkisel tedavilerde olduğu gibi bir doktor gözetimi veya danışmanlığında kullanılmasının zorunlu olduğunu göstermektedir. Böylelikle beklenen etkinin elde edilmesi hem daha olası olacak ve hem de olası yan etkilerin oluşmasını engellemiş olacaktır.

Özellikle ve ağırlıklı olarak analjezik ilaçların metabolizmasında yer alan CYP2C ve bağıl APND aktivitesinde bir değişiklik olmamış olması bu ilaçların metabolizmasında veya etkilerinde bir değişiklik olmayacağı söylenebilir.

Kinonların detoksifikasyonunda rol oynayan NQO1 enzim aktivitesinde, protein ve mRNA düzeyinde artış gözlenmiş olması bu bitkinin pozitif ve iyi etkilerine bir başka artı değer katmaktadır. Tüylü yakıotu karsinojen ajanların etkilerini azaltırken bir diğer yandan da elektrofilik ajanların yıkımını artırarak koruyucu özellikler gösterebilmektedir. Bununla birlikte, NQO1 enziminin tümör baskılayıcı p53 proteininin stabilizasyonunu da artırdığı gerçeği göz önüne alındığında gerçekten önemli derecede antikarsinojen etkiler barındırdığı söylenebilir. Çeşitli hastalıklarda ve kanser türlerinde artış gösteren GST-M ve GST-T aktivitelerinde azalış olması da

tüylü yakıotunun bir başka iyi etkisi olarak ele alınması doğru olacaktır. GST-P düzeyinde ki artış antioksidan etkisinin bir başka göstergesi olarak açıklanabilir. Ancak total GST aktivitesinde azalma gözlenmesi pek anlaşılır bir etki değildir.

Ayrıca, tüylü yakıotu ekstresinin östrojen metabolizmasında yer alan aromataz enzim düzey ve aktivitesinde bir azalmaya neden olması antiöstrojenik etkisini açıklamaktadır. Aromataz aktivitesi meme kanseri gibi çeşitli kanserlerde artmaktadır. Yakıotunun antiöstrojenik etkisinden dolayı meme kanseri gibi östrojen bağımlı kanserlerden korunmak için tüylü yakıotu uygun dozlarda tüketilebilir.

Hücre Kültürü ile İlgili Çalışma Sonuçları:

Elde edilen tüylü yakıotu ekstresinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak ve var ise normal ve kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksikite farklarını belirlemek amacıyla hem kanser olmayan hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki araştırılmış ve hem de sitotoksik dozlar belirlenmiştir. Hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan tüylü yakıotunun bu sitotoksik etkisini hangi mekanizmayı kullanarak gerçekleştirdiği anlamak PTEN, p53, p21 gibi tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarına etkisi araştırılmıştır. Western blot analizleri sonucunda açıkça görüldüğü gibi PTEN tümör baskılayıcı geninin ekspresyonunu tüylü yakıotu ekstresi konsantrasyona bağlı olarak kontrole oranla sadece PC14 akciğer kanser hücrelerinde azaltırken, kanser olmayan fibroblastik hücre dizisi olan 3T3 hücrelerinde arttırmaktadır. Fakat diğer hücrelerde PTEN ekspresyonuna bir etkisi gözlenmemiştir. PTEN, fosfataz olarak rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. Akciğer kanseri hücrelerinde bu genin baskılanması yakıotunun akciğer kanserine karşı koruyucu olduğunun göstergesi olabilir.

Tüylü yakıotunun p53 tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu kanser ve kanser olmayan hücre hatlarında herhangi bir etki göstermemesi, bu hücrelerin sitotoksik etkisini gösterirken p53 yolağını kullanmadığını göstermektedir.

Proteom Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar:

Yapılan bu enzim aktivite deneylerinin yanı sıra bu dönemde moleküler mekanizmalara ışık tutmak için proteom deneylerine ağırlık verilmiştir. Azalan ya da tamamen kaybolan veya yeniden ortaya çıkan spotlar seçilmiştir. Analiz sonuçlarından elde edilen değerlendirmeye göre 19 proteinde değişim gözlenmiştir. Bu proteinlerde 2-okzoizovalerat dehidrogenaz alfa alt ünitesi, alfa-keto asitlerin asetil-KoA'ya dönüşümünü katalize eder (Meneses-Lorente ve ark. 2004). Enoil-KoA hidrataz ise yağ asit metabolizmasında asetil-KoA ve enerji üretmek için açıl-KoA'nın iki ve üçüncü karbonları arasındaki çift bağı kırar. Bu iki enzimdeki artış *Epilobium hirsutum* uygulanmış deneklerde asetil-KoA miktarının artmış olduğunu göstermektedir. Asetilkolin, kolinerjik nöronların gövdesindeki belirli nöronlarda asetil-KoA ve kolinin asetilkolintransferaz enzimi tarafından birleştirilmesiyle oluşur. Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal iletilici olmasının yanı sıra parasempatik sinir sisteminde de yer almaktadır. Çizgili kasların kasılmasına sebep olduğu gibi öğrenme ve hafıza ile ilgili de derin bir ilişkisi vardır. Asetilkolin bugün Alzheimer ve Parkinson hastalarının patogenezinde önemli bir yere sahiptir. Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması ile karakterizedir. Bu hastalıkta en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir. Ayrıca Alzheimer hastalarında hipokampal kolinerjik nöron stimüle edici peptitlerinin (HCNP) ekspresyonunun azaldığı gözükmetedir (Maki 2002) Yapılan çalışmalara göre asetil Ko-A miktarının artıp, fosfotidiletanolamin bağlayıcı protein gibi nöron stimüle edici peptitlerin (HCNP) azalması, verilen bu dozda hastalığa neden olmasına sebep olabilir. Ayrıca, bu veri EHR verilen hayvanlarda gözlenen kilo kaybının açıklanmasına da yardımcı olmakta ve desteklemektedir. Bu enzim alfa keto asitlerin yağ asit metabolizmasında beta oksidasyonu artırmaktadır. Böylelikle, proteinlerden üretilen amino asitler ve bunların alfa asitleri, asetil KoA yolağında yıkılarak enerji olarak tüketilmektedir. Sonuç olarak, bunun neticesinde kilo kaybı gerçekleşmektedir.

Alkole olan duyarlılık aldehit dehidrogenaz 2 (ALDH2) enziminin genetik eksikliği ile ilgilidir. Daha önceki çalışmalarda bu enzimin eksikliği Alzheimer hastaları için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Ancak nöron hücrelerinde bu eksikliğin biyolojik etkisi anlaşılamamıştır. Ayrıca ALDH2'nin oksidatif strese karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Denek gruplarında ALDH2 enzimin artmış olması yine asetil-KoA miktarının artmış olduğunda bir başka göstergesidir (Ikuroh 2003). Mitokondriyel

aldehit dehidrogenaz 2 (ALDH2) asetaldehit detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Sonuç olarak, bu enzimdeki artış EH'nin bir başka faydalı etkisi olarak değerlendirilebilir.

Diğer taraftan nöromasküler hastalık olan miyasteni gravis'de ise vücut asetilkolin reseptörüne karşı antikor üreterek düzgün bir asetilkolin sinyal transferini önler. Fosfotidiletanolamin bağlayıcı protein (PEBP) hipokampal kolinerjik nöron stimüle edici peptitlerinin (HCNP) merkezi sinir sistemindeki presinaptik kolinerjik nöronların fonksiyonlarını içerir. HCNP kolin asetiltransferaz üretiminin artmasında artar. Yapılan çalışmada çıkan sonuçlara göre fosfotidiletanolamin bağlayıcı proteinin (PEBP) azalmış olması kolin asetil transferaz enziminde azalma olduğunu göstermektedir. Asetil-KoA miktarının artıp, kolin asetil transferaz enziminin azalmış olması, bu ekstrenin içindeki bir maddenin asetilkolin gibi davrandığını gösterebilir. Miyasteni gravis diğer otoimmün hastalıklarla beraber olabilmektedir. Fakat en sık beraber olduğu hastalık tiroid hastalığıdır. Protein disülfid izomeraz tiroid hormonunun sentezi ve taşınmasında önemli rol oynar. Protein disülfid izomerazın denek grubunda artmış olması tezimizi desteklemektedir. Ayrıca denekler üzerinde yapılan gözlemlerde enjeksiyondan sonra hayvanların özellikle kısa süreli bacak kaslarına hakim olamayıp sürünmeleri, agresif davranmaları gibi belirtiler belirtilen dozlarda bu ekstrenin Miyasteni gravis gibi nöromasküler bir hastalığa neden olduğunu destekliyor olabilir.

Fosfotidiletanolamin bağlayıcı protein (PEBP) nöronlardaki fonksiyonu dışında birçok yerde rol alır. PEBP ailesi çeşitli organizmalarda birçok dokuda tanımlanmış yüksek derecede korunmuş protein ailesidir. PEBP, lipit, fosfotidiletanolamin, ATP, opioidleri bağlar. Diğer adı da morfin bağlayıcı proteindir. Bir serin proteaz inhibitörüdür. Trombin, nöposin ve kimotripsinin inhibisyonunu sağlar. Serin proteazlar, sindirim, immün cevap, kan pıhtılaşması gibi çeşitli fizyolojik rollere sahiptir. PEBP, MAP kinaz ve NF-kappa B gibi birçok sinyal yolağının regülasyonu gibi önemli görevleri vardır. MAP kinaz ve NF-kappa B mitoz, hücre çoğalması, gen ekspresyonu, apoptozisin regülasyonunu sağlar. Bu nedenle, EH'nin bu etkisi daha detaylı çalışılması gereklidir.

Protein disülfid izomeraz ise, protein disülfid bağlarının oluşumu, kırılması ve yeniden düzenlenmesinde rol alır. Yüksek konsantrasyonlarda katlanmış proteinlerin

agregasyonunu inhibe ederek şaperon görevi görür. Askorbik asitin oksidasyonuna katkıda bulunur (Wells 1990).

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun değişmesi; kas kasılması-gevşemesi, hücre mortalitesi, protein sentezi, salgılanması ve katlanması, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptozis gibi çeşitli hücresel fonksiyonları düzenler. Bununla ilgili en çok çalışılan proteinler Glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78), Glukoz düzenleyici protein 94 (GRP94, endoplazmin), protein disülfid izomeraz A6 (PDI-A6) ve kalretiküldür (Pozzan ve ark. 1994). Bu proteinler ER lümenine lokalize olmuş ısı şok protein ailesindedir. Şaperon olarak ta görev almaktadırlar. Yeni sentezlenen proteine bağlanır ve onların ER içine translokasyonunu sağlar. Katlanma ve oligomerizasyondan sorumludur. Bunlardan GRP78 ve GRP94 çeşitli stres durumları, glukoz açlığı, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun değişmesi durumunda artar. Normal büyüme şartları altında GPR-78 yoktur ama indüklenmiş şartlar altında ER'deki katlanmamış polipeptitlerin toplanması için sentezlenir. Şaperon benzeri proteinlerin (GRP-78, GRP-94, PDI-A6) ve perirodoksinin azalması karaciğer yağlanmasına sebep olabileceğine göstermektedir. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi 2-oxoisovalerat dehidrogenaz asetil-KoA üretiminde görevlidir, trigliserit birikiminde de önemli rol oynar. Buda bu enzimlerin korelasyon içinde olduğunu göstermektedir. Ayrıca biyokimyasal veriler (AST-ALT) ve gözlemlerimiz bunu desteklemektedir (Meneses-Lorente ve ark. 2004). İmmünolojik aktivitelerde, inflamasyonda, stres gibi durumlarda protein ekspresyon düzeyi artar.

Protein disülfid izomerazın A6 (kalsiyum bağlayıcı protein I) trombosit agregasyonu ve redoks tepkimlerinde sinyal görevi yaptığı bilinmektedir. Hücre yüzeyinde protein disülfid izomerazın redoks durumunun kontrolünde kinol oksidaz veya kinol redüktaz tartışılmaktadır.

Kalretikülin, diğerlerinden farklı lüminal ER proteindir. Gen ekspresyonunun modülasyonu (Dedhar ve ark. 1994) hücre adhezyonu (Coppolino ve ark. 1995) intrasellüler kalsiyumun kontrolü gibi farklı fonksiyonları vardır (Liu ve ark. 1994). Normal hücrelerde fonksiyonu N-bağlı glikolizasyonda katlanmamış glikoz kalıntılarını oligosakkarit zincirlere ekler. Kalretikülinin amino ucu, glukokortikoid reseptörlerin DNA bağlama domeni ile etkileşim halindedir. Androjen ve retinoik asit reseptörlerinin transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. Kalretikülin, birçok kanser hücresinde

ekspresyonu vardır. CRT aktivitesi bloklanınca kanser hücrelerini yok olurken, normal hücreler etkilenmemektedir. Ayrıca kolon ve pankreas kanserinde kalretikülin ile ilişkilidir (Hong ve ark. 2004).

Peroksiredoksin-2 ve Peroksiredoksin 6, redoks reaksiyonunda önemli rol oynayan antioksidan proteinlerdir, bu proteinlerin ekspresyonları EHT grubunda azalmıştır. Bu da EHT'nin antioksidan bir madde olduğunu göstermektedir. Peroksiredoksin-2 tiyol spesifik antioksidan proteindir. Tiyoredoksin sistemiyle peroksitleri azaltır. H₂O₂'nin hücre içi konsantrasyonunu düzenleyerek, büyüme faktörleri ve tümör nekroz faktör-alfanın sinyal kaskadına katılabilir. Peroksiredoksin-6 oksidatif hasarın korunmasının yanı sıra fosfolipit turnover sayısının regülasyonunu azaltabilir.

Vitelojenin-2, yumurtlayarak çoğalan canlıların erken dönemlerinde protein öncüsüdür. Bal arıları abdomen ve karınlarında vitelojenin depolar. Glikoprotein olan vitelojenin antioksidan olarak görev yapan bir hormondur.

Arjinaz, (L-arjinin amidinohidrolaz; E.C.3.5.3.1) nitrojen metabolizmasından sorumlu anahtar enzim (Erbas 2007) olarak L- Argininin, üre ve ornitine hidrolize olmasını katalizler (Porembaska 2003). Arginaz enziminin Arjinaz I ve Arjinaz II olmak üzere iki izoformu vardır. AI (hepatik arginaz) sitosolik bir enzimdir ve karaciğerde yer alır, esas olarak üre sentezi ve amonyağın detoksifikasyonu ile ilgilidir. Arginaz enzim aktivitesi varlığı, meme bezi, beyin, barsak, böbrek ve akciğer gibi birçok karaciğer dışı organda da bulunmuştur. Ekstraheptik arjinazın hücre üremesi ve doku tamiri gibi düzenleyici mekanizmalara katılabileceği öne sürülmüştür (Jenkins 1995). Arjinazın kanserle yakından ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar; kalın barsak, kolorektal, prostat, mide ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında serum ve doku arginaz düzeyinin arttığını göstermekte ve araştırmacılar arjinazın kanser vakaları için belirleyici bir enzim olabileceğini ileri sürmektedirler. Meme kanserli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda da serum arjinaz aktivitesi, sağlıklı kadınlardakinden yüksek bulunmuştur (Kingsnorth 1984). Arjinaz enzimiyle ortak substratı kullanan NOS (nitrik oksit sentaz), L-arginini NO (nitrik oksit) ve sitriline parçalayan enzimdir. Kanserde arttığı bilinen arjinaz enzimi ve NOS, arjinini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar. Antikarsinojenik bir ajan olarak düşünebileceğimiz *Epilobium hirsutum*'un doku arjinaz enzimini inhibe ettiği

gösterilmiştir, başta NOS yolağı olmak üzere başka yollara da bakılarak hangi yolak üzerinden etki gösterdiği çalışılabilir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan *Epilobium hirsutum*'un bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

İzositrat dehidrogenaz (IDH), sitrik asit döngüsünde izositratı, α -ketoglutarata dönüştüren enzimdir. Lösemili hastalarda izositrat dehidrogenaz enzimi glioma hücrelerinde mutasyona uğramıştır. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, IDH mutant proteinlerde izositrat bağımlı NADPH üretiminde azalma gözlenmiştir. Reaktif oksijen türlerine karşı korumak için IDH'nın aşırı ekspresyonu gerekmektedir. *Epilobium hirsutum*'un ekstresi uygulanmış deneklerde IDH ekspresyonu artmıştır, bu gösteriyor ki ROS, radyasyon ve ya çevresel zararlı etkilerden korunmak için günlük diyet bu ekstre ile kullanılmalıdır.

Tanımlanan proteinlerden bazıları aminoasit metabolizmasında yer almaktadır. Fumarilasetoasetaz ve 4- hidroksifenilpiruvatdioksijenaz tirozin metabolizmasında yer alan iki enzimdir. Fumarilasetoasetaz, fumaratın asetoasetata hidrolizini sağlayan tirozin katabolizma yolağının son enzimidir. Eksikliğinde Tip I trizonemia oluşur. Tip I triozemia hastalığı, fumarilasetoasetaz enziminde ki mutasyon nedeniyle fumarilasetoasetatın birikmeye başlaması ile oluşur ve zamanla karsonejik etkiler gözlenmeye başlar. EHT uygulanmış denek grubunda fumarilasetoasetaz enzimindeki artış, fumarilasetoasetaz enzimi mutasyona uğramış tip I trizonemi hastalarında diyetle kullanımını için uygundur (Cassiman 2009). Tirozin katabolizma yolağının 2. basamağında görevli 4- hidroksifenilpiruvatdioksijenaz (HPPD), 4- hidroksifenilpürivatı, homojentisata çeviren demir içeren diğer bir enzimdir. Bu enzimin mutasyona uğraması durumunda da Tip III triozemia hastalığı oluşur. Fumarilasetoasetaz enzimi artarken, 4- hidroksifenilpiruvatdioksijenaz enzimindeki azalma gözükmemektedir. Ayrıca 2-okzoizovalerat dehidrogenaz (dallı zincirli alfa-keto dehidrogenaz kompleksi) valin, lösin, izolösin gibi negatif yüklü aminoasitlerin degradasyonuna katılır. Dallı zincirli aminoasitleri oluşturan valin, lösin ve izolösinin yıkım basamakları birbirine benzer. Valin transaminaz ile lösin ve izolösin transaminaz farklı enzimler olmakla birlikte bu üç esansiyel aminoasidin ketoasit türevlerinin dekarboksilasyonunda tek bir enzim sistemi rol oynar. Bütün organik asitler ara metabolitlerdir ve transaminazlar dışında, yıkımda rol oynayan en-

zimlerden her birinin eksikliği asidoza yol açar. İzovaleiril-KoA dehidrogenaz (IVD) diyetle elde edilen proteinlerin işlenmesinde önemli rol oynar. Vücut gıdalardan alınan proteinleri aminoasitlere parçalar. Aminoasitler vücutta büyüme ve gelişme için gerekli enerjiyi sağlamak için kullanılabilir. IVD, lüsini enerjiye dönüştürmeye yardımcı olur. IVD'deki mutasyon isovaleirik asidemiye sebep olur (Rhead ve Tanaka 1980). Sonuç olarak, bu proteinlerde gözlenen değışikliklerde EHT'nin amino asit katabolizmasını artırdığı tezimizi desteklemektedir.

Gerçekleştirilen deneyler ve elde edilen tüm bulgular, uygun dozlarda kullanıldığında tüylü yakıtunun kanser dahil çeşitli hastalıklar için kullanılabilir çok önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni veya alternatif koruyucu ve/veya destek etmeni olduğunu göstermektedir. Fakat belirli dozlarda özellikle nöromasküler hastalıkları tetikleme potansiyeline sahiptir. Bu kadar pozitif ve iyi etkiyi bünyesinde barındıran önemli bir bitki olduğu muhakkaktır. Ancak, bireysel doz ayarlaması yapılması da mutlak gereklidir.

5. KAYNAKLAR

- Abei, H. Catalase. Method of enzymatic analysis. New York: Academic Press; pp. 673-84. (1974).
- Acquaviva, R., Russo, A., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Barcellona, M. L., Avitabile, M., Vanella, A. (2002). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of resveratrol. *J. Food Sci.* 67: 137-141.
- Adalı, O., AbuBaker, T., Arınc, E. (1996). Immunological and sub-structural characterization of sheep lung microsomal cytochrome P450LgM2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 363-372.
- Apostolides, Z., Balentine, D.A., Harbowy, M.E., Hara, Y., Weisburger, J.H. (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutat. Res.* 389:167-172.
- Arınc, E., Philpot, R.M. (1976). Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *J. Biol. Chem.* 251: 3213-3220.
- Arınc, E., Adalı, O., İşcan, M., Güray, T. (1991). Stimulatory effects of benzene on rabbit liver and kidney microsomal cytochrome P-450 dependent drug metabolizing enzymes. *Arch of Toxicol.* 65: 186-190
- Arınc, E., Adalı, O., Gençler-Özkan, A.M. (2000). Induction of N-nitrosodimethylamine metabolism in liver and lung by in vivo pyridine treatment of rabbits. *Arch of Toxicol.* 74: 329-334.
- Arınc, E., Arslan, Ş., Bozcaarmutlu, A., Adalı O. (2007). Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem Toxicol.* 45: 107-118.
- Arınc, E., Sen, A. Effects of in vivo benzo(a)pyrene treatment on liver microsomal mixed-function oxidase activities of gilthead. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C: 404-414. (1994).
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, S.L., La Du, B.N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein and preserves its functions. *J Clin Invest.* 101: 1581-1590.
- Barakat, H.H., Hussein, S.A.M., Marzouk, M.S., Merfort, I., Linscheid, M., Nawwar, M.A.M. (1997). Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. *Phytochemistry.* 46: 935-941.
- Baytop, T. (1994). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları No:578, Ankara.
- Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün (İlaveli İkinci Baskı). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Ss 139-141, İstanbul.
- Blumenthal, M. (1999). Herb market levels after .five years of boom, *Herbal Gram.* 47: 64-65.
- Bray, B.J., Perry, N.B., Menkes, D.B., Rosengren, R.J. (2002). St. John's Wort Extract Induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster Mouse. *Toxicol. Sci.* 66: 27-33.
- Bu-Abbas, A., Clifford, M. N., Walker, R., Ioannides, C. (1999). Modulation of hepatic cytochrome P450 activity and carcinogen bioactivation by black and decaffeinated black tea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7: 41-47.
- Buhler, D.R., and Wang-Buhler, J.L. (1998). Rainbow trout cytochrome p450s: purification, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 121C: 107-137.
- Bulavin, D.V., Korpishchenko, A.I., Gubanov, A.L., Rechetov, A.V. (1996). Glutathione s-transferase pl-1 in normal and cancerous lung tissue: properties, function, and possible mechanisms for regulating activity. *Biokhimia.* 61:1015-1027.
- Burke M.D, Mayer R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially induced by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos.* 2: 583-588. (1974)

- Canivenc-Lavier, M.C., Vernevaout, M.F., Totis, M., Siess, M.H., Magdalou, J., Suschetet, M.(1996). Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*. 114: 19-27.
- Cassiman, D., Zeevaert, R., Holme, E., Kvittingen, EA., Jaeken, J. A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): a case report. (2009)
- Catterall, F., McArdle, N.J., Mitchell, L., Papayanni, A., Clifford, M.N., Ioannides, C. (2003). Hepatic and intestinal cytochrome P450 and conjugase activities in rats treated with black tea theaflavins and theaflavins. *Food Chem. Toxicol.* 41:1141-1147.
- Chan, H.Y., Chen, Z.Y., Tsang, D.S., Leung, L.K. (2002). Baicalein inhibits DMBA-DNA adduct formation by modulating CYP1A1 and CYP1B1 activities. *Biomed. Pharmacother.* 56: 269-275.
- Chen, C., Kong, A.N. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med.* 36: 1505-1516
- Chopra. R. N., Nayar. S. L., Chopra. I. C. (1986). *Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement)*. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.
- Ciolino, H.P., Wang, T.T., Yeh, G.C. (1998). Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* 58: 2754-2760.
- Ciolino, H.P., Yeh, G.C. (1999). The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br. J. Cancer.* 79: 1340-1346.
- Cochin, J., Axelrod, J. Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125: 105-110. (1959).
- Conney, A.H. (2003). Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 1-30.
- Connolly, J. D., Hill, R. A. (1997). Triterpenoids. *Natl Product. Rep.* 14: 661-679.
- Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science.* 22: 400-402.
- Coppolino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S., Wilkins, J. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem.* (1995).
- Crone, C. C., Wise, T. N. (1997). Survey of alternative medicine use among organ transplant patients, *J. Transplant. Coord.* 7: 123-130.
- Çubukçu, B. *Analitik Farmakognozi (Bitkisel Drogların Kalitatif Fizikokimyasal Analizleri)*. Üniversite Yayın No: 3710, Fakülte Yayın No: 62, Cilt I, II. Baskı, İstanbul, İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi. (1992).
- Davis, P. H. (1972). *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 4, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Davis, P.H. (1965). *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*. Vol:1, Edinburg Univ. Press, Edinburg.
- Davis, P.H. *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 4, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh. (1972).
- Davis, P.H. *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 6, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh. (1978).
- Davis, P.H. *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 7, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh. (1982).
- Davis, P.H. *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 8, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh. (1984).

- Dedhar, S., Rennie, P.S., Shago, M., Hagesteijn, C.Y., Yang, H., Filmus, J., Hawley, R.G., Bruchovsky, N., Cheng, H., Matusik, R.J. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*. (1994).
- Doostdar, H., Burke, M. D., Mayer, R. T. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*. 144: 31-38.
- Dwyer, J. (1995). Overview: dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *J. Nutr.* 125: 6566-6572.
- Erbas, H., Aydogdu, N., Usta, U., Erten, O. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. *Cell Biology International*; 31: 1414-1419.(2007)
- Ernster, L. (1967). DT-diaphorase *Methods Enzymol.* 10: 309-317.
- Ernster, L., Ljunggren, M. and Danielson, L. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 2: 88. (1960).
- Ernster, L., Ljunggren, M., Danielson, L. (1980). Transfer of phospholipids between the endoplasmic reticulum and mitochondria in rat hepatocytes in vivo. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2: 88-92.
- Estabrook, R.W. (1996).The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB J.* 10: 202-204.
- Evans W.E., Relling M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 286(5439): 487-91.
- Everest, A., Öztürk, E. (2005). Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 1(6): 1-28.
- Ey, P.L., Ashman, L.K. The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin and immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *Method in Enzymology*. 121: 497-509. (1986).
- Fugh-Berman, A., Ernst, E. (2001). Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52: 587-595.
- Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metab. Drug. Interact.* 17: 311-349.
- Gasper, J., Laires, A., Monteiro, M., Laureano, O., Ramos, E., Rueff, J. (1993). Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis*. 8: 51-55.
- Gençler-Özkan, A.M. Pınarbaşı (Kayseri) Florası Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. (2002).
- Gordon, P.B., Holen, I., Seglen, P.O. (1995). Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *J Biol Chem*. 270: 5830-5838
- Grieve, M.A. (1984). *Modern Herbal. A Modern Herbal (Volume 1, A-H): The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folk-Lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs & Trees with Their Modern Scientific Uses (Paperback) ISBN 0-14-046-440-9.*
- Gruenwald, J. (2000). The supplement markets in the US and Europe, *Neutrachem. World* (July/August), 36-37.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases. the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol.Chem.* 249: 7130-7139. (1974).
- Hao, N.J., Huang, M.P., Lee, H. (1995). Structure-activity relationships of anthraquinones as inhibitors of 7-ethoxycoumarin O-deethylase and mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Mutat. Res.* 328: 183-191.
- Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C, Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P. (1999). Human cytochromes P450. *Mol. Aspect of Med.* 20: 1-137.

- Hayes, J.D., Mantle, T.J. (1986). Use of immunoblot techniques to discriminate between the glutathione s-transferase *γ*, *κ*, *γ*, *ν*/*γ* and *γ* subunits and to study their distribution in extra-hepatic tissues. *Biochem. J.* 233: 779-788.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995). The glutathione s-transferase supergene family: regulation of *gst* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 6: 445-600.
- Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R. (2000). In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica.* 30: 35-251.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem-Biol. Interact.* 139: 1-21.
- Hong, SH, Misek, DE., Wang, H., Puravs, E., Thomas, J., Giordano, Brenner, DE. , Simeone, DM., Samir M. An Autoantibody-Mediated Immune Response to Calreticulin Isoforms in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* August 1, 2004 64; 5504 . (2004).
- Ikuroh, O., Kiyomi, N., Chie, Y., Kouzin, K. and Shigeo, O. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry.* (2003).
- Imai, Y., Ito, A., Sato, R. Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* 60:n417-428. (1966).
- Ivancheva, S., Manolova, N., Serkedjeva, J., Dimov, V., Ivanovska, N. (1992). Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. *Basic Life Sci.* 59: 717-728.
- James, M.O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M.C. (2005). Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. *Aquat Toxicol.* 72: 361-371.
- Jefcoate, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. (2000). Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 95-112.
- Jenkins, DC., Charles, IG., Thomsen, LL., Moss, DW., Holmes, LS., Baylis, SA. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA;* 92: 4392-4396. (1995).
- Jeong, H.G. (1998). Suppression of constitutive and inducible cytochrome P450 gene expression by alpha-hederin in mice. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* 46: 1019-1026.
- Jeong, H.G., Lee, S.S. (1999). Suppressive effects of alpha-hederin on 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated murine *Cyp1a-1* expression in the mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells. *Cancer Lett.* 138: 131-137.
- Kang, K.W., Park, E.Y., Kim, S.G. (2003). Activation of CCAAT/ enhancer-binding protein beta by 2'-O-amino-3'-O-methoxyflavone (PD98059) leads to the induction of glutathione S-transferase A2. *Carcinogenesis.* 24: 475-482.
- Kingsnorth, AN., Wallace, HM., Bundred, NJ., Dixon, JM. Polyamines in breast cancer. *Br J Surg;* 71 (5): 352-6. (1984)
- Kohn, M. C., Walker, N. J., Kim, A. H., Portier, C. J. (2001). Physiological modeling of a proposed mechanism of enzyme induction by TCDD. *Toxicology.* 162: 193-208.
- Kubowitz, F., Ott, P. Isolierung und krystallisation eines garungsfermentes aus tumoren. *Biochem. Z.* 314: 94-102. (1943).
- Kumar, N., Allen, K., Riccardi, D., Kazi, A., Heine, J. (2004). Isoflavones in breast cancer chemoprevention: where do we go from here? *Front Biosci.* 9: 2927-2934.
- Kyhse-Anderson, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10: 203-209. (1984).
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 2: 363-386.

- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-684. (1970).
- Lee, S.E., Campbell, B.C., Molyneux, R.J., Hasegawa, S., Lee, H.S. (2001). Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B-1 biotransformation. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5171-5177.
- Lin, J.H., Lu, A.Y.H. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications, *Clin. Pharmacokinet.* 35: 361-390.
- Liu, E.H., Turner, L.M., Lin, S.X., Klaus, L., Choi, L.Y., Whitworth, H., Ting, W., Oz, M.C., (2000). Use of alternative medicine by patients undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120(2): 335-41.
- Liu, G., Pessah, INMolecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *J Biol Chem.* 30;269(52):33028-34. (1994).
- Longo, V., Amato, G., Salvetti, A., Gervasi, P.G., (2000). Heterogeneous effects of anthraquinones on drugmetabolizing enzymes in the liver and small intestine of rat. *Chem.-Biol. Interact.* 126: 63-77.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275. (1951).
- Lu, A.Y.H., and Lewin, W. (1974). The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochem. Biophys. Acta.* 344: 205-240.
- Machala, M., Kubinova, R., Horavova, P., Suchy, V. (2001). Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother. Res.* 15: 114-118.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N. (1991). Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286: 152-154.
- Maki, M., Matsuwaka, N., Yuasa, H., Otuska, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R., Ojika, K. Decreased Expression of Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide Precursor Protein mRNA in the Hippocampus in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* (2002).
- Maliakal, P.P., Coville, P.F., Wanwimolruk, S. (2001). Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 569-577.
- Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47: 469-74. (1974).
- McLemore, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., Eggleston, J.C., Boyd, M.R., Hines, R.N. (1990). Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1333-1339.
- Meneses-Lorente, G., Guest, PC., Lawrence, J., Muniappa, N., Knowles, MR., Skynner, HA., Salim, K., Cristea, I., Mortishire-Smith, R., Gaskell, SJ., Watt, A. A proteomic investigation of drug-induced steatosis in rat liver. *Chem Res Toxicol.* 17(5):605-12. (2004).
- Miller, W.R., Anderson, T.J., Jack, W.J. (1990). Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37: 1055-1059.
- Mosialou, E., Ekstrom, G., Adang, A.E.P., Morgenstera, R. (1993). Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmac.* 45: 1645-1651.
- Mueller, S.O., Stopper, H., Dekant, W. (1998). Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome p450 enzymes-bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 26: 540-546.

- Nagai, T., Suzuki, Y., Tomimori, T., Yamada, H. (1995). Antiviral activity of plant flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 295-302.
- Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421. (1953).
- Nebbia, C., Dacasto, M., Carletti, M. (2003). Postnatal development of hepatic oxidative, hydrolytic and conjugative drug-metabolizing enzymes in female horses. *Life Sci.* 74: 1605-1619.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 6: 1-13.
- Nebert, D.W., Gonzalez, F.J. (1987). P-450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 945-993.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujikuriyama, Y., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J. (1991). The p450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA CellBiol.* 10: 1-14.
- Nelson, D.R. (2003). Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate p450 evolution. *Arch. Biochem. Biophys.* 409(1): 18-24.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 6: 1-43.
- Obach, R.S. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 88-95.
- Okita R.T., Masters B.S.S. (1997). Biotransformation: The Cytochromes P450 in: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations* (edited by Devlin T.M. A John Wiley and Sons INC., Publications, New York), 982-998.
- Oleksiak, M.F., Wu, S., Parker, C., Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., Stegeman, J. J. (2002). Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 411: 223-234.
- Orellana, M., Guajardo, V., Araya, L., Rodrigo, T. (2001). Oxidative stress, microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in the liver of rats treated with acetone. *Comp. Biochem. Physiol.* 128: 503-509.
- Ozkarsli M., Sevim H., Şen A. (2008). In vivo effects of *Urtica urens* on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats. *Xenobiotica.* 38: 48-61.
- Paglia, E.D., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70: 156-9. (1967)
- Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H., Pasanen, M. (2000). CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology.* 144: 139-147.
- Peters, W.H., Roelofs, H.M., Hectors, M.P., Nagengast, F.M., Jansen, J.B. (1993). Glutathione and glutathione S-transferases in Barrett's epithelium. *Br. J. Cancer.* 67: 1413-1417.
- Pianetti, S., Guo, S.Q., Kavanagh, K.T., Sonenshein, G.E. (2002). Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res.* 62: 652-655.
- Porembaska, Z., Luboinski, G., Chrzanowska, A., Mielczarek, M., Magnuska, J., Baranczyk-Kuzma, A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta;* 328: 105-111. (2003)
- Pozzan, T., Rizzuto. R., Volpe, P., Meldolesi, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* (1994)

- Reitman, S., Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 28(1): 56-63. (1957).
- Rhead, W.J., Tanaka, K. Demonstration of a specific mitochondrial isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency in fibroblasts from patients with isovaleric academia. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 77, No. 1, pp. 580-583, January 1980 Medical Science.* (1980).
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8: 797-807.
- Roberts-Kirchhoff, E.S., Crowley, J.R., Hollenberg, P.F., Kim, H. (1999). Metabolism of genistein by rat and human cytochromes P450s. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 610-616.
- Sahu, S.C., Gray, G.C. (1994). Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* 85: 159-164.
- Schenkman, L. B., Cinti, D. L. Preparation of microsomes with calcium. *Methods in Enzymology.* 52: 83-89. (1978).
- Semiz A., Şen A. (2007). Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (bitter melon) fruit extract. *African Journal of Biotechnology.* 6: 273-277.
- Sen, A., Kirikbakan, A. Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry (Mosc).* 69(9): 993-1000. (2004).
- Shih, H., Pickwell, G.V., Quattrochi, L.C. (2000). Differential effects of flavonoid compounds on tumor-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 287-294.
- Shukla, Y., Taneja, P. (2002). Anticarcinogenic effect of black tea on pulmonary tumors in Swiss albino mice. *Cancer Lett.* 176: 137-141.
- Silva, I.D., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Laires, A., Rueff, J. (1997). Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin. *Mutat Res.* 393: 247-257.
- Sivaraman, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L. (1994). CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54: 3692-3695.
- Smith, T.J., Guo, Z., Guengerich, F.P., Yang, C.S. (1996). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis.* 17: 809-813.
- Sun, M.Z., Sakakibara, H., Ashida, H., Danno, G., Kanazawa, K. (2000). Cytochrome P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1373-1378.
- Şen A., Semiz, A. (2007) Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (*Liza saliens*). *Ecotoxicology Environmental Safety.* 68(3): 405-411.
- Şen, A., Arınç, E. (2000). Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver (*Liza saliens*) microsomes. *Comp. Biochem. Physiol.* 126C: 235-244.
- Şen, A., Hu, C.-H., Urbach, E., Wang-Buhler, J.-L., Yang, Y.-H., Arınç, E., Buhler, D. R. (2001). Cloning, sequencing and characterization of CYP1A1 cDNA from leaping mullet (*Liza saliens*) liver and implications for the potential functions of its conserved amino acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 243-255
- Tanker, M., Koyuncu, M., Coşkun, M., İlisulu, F., Sezik, G. Ermenek-Mut-Gölnar Yöresinin Tıbbi Bitkileri ve Bunların Ana Etken Maddelerinin Saptanması. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Temel Bilimler Grubu Proje No: TBAG-496. Ankara. (1983).
- Tanker, M., Şarer, E., Atasü, E., Yenen, M., Özkal, N., Kurucu, S. Farmakognozi Uygulama Örnekleri, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. (1986).
- Thomas, K.J., Nicholl, J.P., Coleman, P., (2001). Use and expenditure on complementary medicine in England; a population based survey. *Complementary Therapies in Medicine.* 9: 2-11.
- Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., Saso, L. (2001). Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *II Farmaco.* 56: 341-343.

- Tovey, E. R., Baldo, B. A. Comparison of semidry and conventional tank buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis*. 8: 384-387. (1987).
- Ueng, Y.F., Jan, W.C., Lin, L.C., Chen, T.L., Guengerich, F.P., Chen, C.F. (2002). The alkaloid rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 30: 349-353.
- Vitalone, A., Bordi, F., Baldazzi, C., Mazzanti, G., Saso, L., Tita, B. (2003). Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L. *Il Farmaco*. 56: 483-489
- Vitalone, A., McColl, J., Thome, D., Costa, L.C., Tita, B. (2001). Characterization of the effect of epilobium extracts on human cell proliferation. *Pharmacol.*, 69: 79-87.
- Wang, H., Wang, Y., Chen, Z.Y., Chan, F.L., Leung, L.K. (2005). Hydroxychalcones exhibit differential effects on XRE transactivation. *Toxicology*. 207: 303-313.
- Wang, H.W., Chen, T.L., Yang, P.C., Ueng, T.H. (2001). Induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by emodin in human lung adenocarcinoma cell line CL5. *Drug Metab. Dispos.* 29: 1229-1235.
- Wells, WW., Xu, DP., Yang, YF., Rocque, PA. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *The Journal of Biochemical Science*. 15;265(26):15361-4. (1990)
- Wen, X., Walle, U.K., Walle, T. (2005). 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis*. 26: 803-809.
- Wills, R.B.H., Bone, K., Morgan, M. (2000). Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*. 13: 47-77.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*. 105: 940-949.
- Wroblewski, F., La Due, J.S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med*. 90: 210-215. (1955).
- Yamaori, S., Yamazaki, H., Iwano, S., Kiyotani, K., Matsumura, K., Honda, G., Nakagawa, K., Ishizaki, T., Kamataki, T. (2004). CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*. 19: 120-129.
- Yao, D.G., Ding, S.H., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T. (2000). Detoxication of vinca alkaloids by human P450CYP3A4-mediated metabolism: implications for the development of drug resistance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 387-395.
- Zdunczyk, Z., Frejnagel, S., Wroblewska, M., Juskiwicz, J., Oszmianski, J., Estrella, I. (2002). Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources. *Food Res. Intl.* 35: 183-186.
- Zhou, C., Zhou, D., Esteban, J., Murai, J., Siiteri, P.K., Wilczynski, S., Chen, S. (1996). Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59: 163-171.
- Zhou, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A., Paxton, J.W. (2003). Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab. Rev.* 35: 35-98.
- Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences*. 74: 935-968.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109R012
Proje Başlığı: Yakıotunun Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Proteomik ve Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Orhan ADALI, Prof.Dr. Alaattin ŞEN, Doç.Dr. Hakan AKÇA, Doç.Dr. Ayşe Mine GENÇLER- ÖZKAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Denizli Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.05.2009/ 15.05.2012
Öz (en çok 70 kelime) Son yıllarda, geleneksel tedavilere artan ilgi ile birlikte bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasalların, ksenobiyotik metabolizmasında etken bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak bu moleküllerin metabolizmasını değiştirdiğini, antioksidatif, antimitojenik ve antikanserjenik etkiler gösterdiğini bildiren birçok bilimsel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bu çalışmada normal diyet bileşeni olarak kullanılan Yakıotunun ksenobiyotik metabolizması üzerine etkileri, ilaç-diyet etkileşim potansiyelinin proteomik ve moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır.
Anahtar Kelimeler: Yakıotu, Sitokrom P450, Ksenobiyotik, Proteomik
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

1. Semiz, A., Karakurt, S., Çelik, G., Gençler-Özkan, A. M., Adalı, O., ve Şen, A. (2010) Sıçanlarda Glutasyon S-Transferazlar ve Antioksidan Enzimlerin *Epilobium hirsutum* Bitki Ekstraktları ile Değişimi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran, Denizli, syf: 203-204 (PA038).
2. Gürbüz H., Koç, T., Ozgün O., Arslan Ş., ve Şen, A. (2010) Yakıotu (*Epilobium hirsutum*) ve Ökseotu (*Viscum album*)'ndan Elde Edilen Ekstreler ile Ellajik Asit ve Sınnamik Asitin Muhtemel HMG-KoA İnhibitör Etkileri; 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran, Denizli, syf: 234
3. Ozyurt R., Semiz A., Celik G., et al. (2011) Modulations of drug metabolizing enzymes by in vivo treatment of *Epilobium hirsutum* extract in rat. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 225-226
4. Semiz A., Celik G., Karakurt S., et al. (2011). In vivo effects of *Epilobium hirsutum* extract on different glutathione transferase isozymes. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 233
5. Todurga Z. G., Adali O., Celik G., et al. (2011) Antioxidant capacity of *Epilobium hirsutum* in rats. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 235
6. Karakurt S., Semiz A., Çelik G., Gençler Özkan A.M., Şen A., Adali O. (2012) Molecular studies on inhibitory effects of *Epilobium hirsutum* L. on drug metabolizing CYP1B1, CYP2C6, CYP2D2 and CYP3A4 enzymes in rat liver microsomes. 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 17-21, 2012, Holland.
7. Karakurt S., Semiz A., Çelik G., Gençler Özkan A.M., Şen A., Adali O. "Effects of *Epilobium hirsutum* L. on Liver CYP2E1, CYP1A1, GPx and NQO1 Activities, mRNA and Protein Levels in Rats". Makale hazırlanmış olup SCI kapsamında yer alan bir dergiye gönderme aşamasındadır .
8. Serdar Karakurt "Investigation of the effects of folk medicinal plant *epilobium hirsutum* on cytochrome P450 dependent and antioxidant enzymes: A molecular approach" Doktora Tezi, ODTÜ, Biyokimya Bölümü, Danışman: Prof. Dr. Orhan Adalı, Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Alaattin Şen. Tez çalışmaları devam etmekte olup 2012 yılı içinde tamamlanması beklenmektedir.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarının Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.