



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**CCl₄ İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ARAP ÜZÜMÜ (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) BİTKİ
EKSTRAKTININ FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül EROĞLU
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CCl₄ İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ARAP ÜZÜMÜ (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) BİTKİ
EKSTRAKTININ FİTOKİMYASAL İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül EROĞLU
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

VAN-2021

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2020-8814 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“CCl₄ İle Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Arap Üzüümü (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) Bitki Ekstraktının Fitokimyasal İçeriği Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması”** başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşegül EROĞLU

Tarih: 24/06/2021

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca bilgi, birikim ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a teşekkür ederim.

Fitokimyasal analizlerin yapılmasında yardımcı olan ve yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. M. Emre EREZ'e, Doç. Dr. M. Abdullah YILMAZ'a, ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mert İLHAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Abdulhamit BATTAL ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ'e teşekkür ederim.

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi akademik ve idari personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu çalışanlarına, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına ve çalışmamda her türlü desteği veren Fatih DÖNMEZ, Kendal Erdem DUMAN ve bütün yüksek lisans çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve destekleyen babam Basri KUŞBAY'a, annem Fatma KUŞBAY'a ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Çalışma boyunca her aşamasında yardımını ve desteğini esirgemeyen, beni sabırla ve sevgiyle yönlendiren sevgili eşim Hüseyin EROĞLU'na teşekkür ederim.

ÖZET

EROĞLU A, CCl₄ ile Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Arap Üzümlü (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) Bitki Ekstraktının Fitokimyasal İçeriği ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Van Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. *Muscari neglectum* Guss. Ex Ten. bitkisi içermiş olduğu homoizoflavan, flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid vb. bileşikler sayesinde antienflamatuar, antialerjik, antimikrobiyal, antiromatizmal ve antioksidan özelliklere sahiptir. Halk arasında idrar söktürücü, balgam söktürücü, mide rahatsızlıklarına karşı ve afrodizyak olarak kullanımı vardır. Bu çalışmada *M. neglectum* bitkisine ait toprak üstü (MTÜ) ve soğan (MS) kısımlarına ait etanol ekstresinde; yağ asidi analizi (GC-MS), optimize edilmiş 53 adet fitokimyasal bileşiğe göre içerik analizi (LC-MS/MS), toplam fenolik ve flavonoid içeriği araştırıldı. Ayrıca, karbon tetraklorür (CCl₄) ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *M. neglectum* bitkisi etanol ekstrelerinin antioksidatif etkisi kan serumu, karaciğer, böbrek ve mide dokularında çalışıldı. Toksikite testi sonrası 42 adet *Wistar albino* dişi sıçan 7 gruba ayrıldı. Kontrol, *M. neglectum* toprak üstü (MTÜ) 400 mg/kg ekstre (MTÜ+400 mg/kg), *M. neglectum* soğan (MS) 400 mg/kg ekstre (MS+400 mg/kg), CCl₄ (0.5 ml zeytin yağı+0.5 ml CCl₄ dilisyonu 1 ml/kg, intraperitoneal), CCl₄+MTÜ 400 mg/kg, CCl₄+MS 400 mg/kg ve CCl₄+Silymarin 10 mg/kg oral (CCl₄+SLY) grupları oluşturuldu. Otuz beş günlük muamele sonunda; *M. neglectum* ekstresinin antioksidan rolü için; serum biyokimyasal parametreler, karaciğer, böbrek ve mide dokularında antioksidan savunma unsurlarından süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz enzim aktiviteleri ile redükte glutatyon seviyeleri ve malondialdehit (MDA) içerikleri tespit edilerek değerlendirilmiştir. GC-MS yağ asidi analizine göre, MTÜ etanol ekstresinde oktadekadienoik ve 9,12,15 oktadekatrienoik yağ asitleri (sırasıyla %25.66 ve 21.50), MS etanol ekstresinde 9,12 oktadekadienoik ve oktadekanoik asitler (sırasıyla %28.77 ve 21.73) majör yağ asitleri olarak bulundu. LC-MS/MS sonuçlarına göre MTÜ etanol ekstrede kinik asit, fumarik asit, gentisik asit, kafeik asit, kemferol ve apigenin (sırasıyla, 1.726, 5.771, 0.138, 0.052, 0.035 ve 0.092 ug/g) ve MS etanol ekstresinde kinik asit, fumarik asit, kafeik asit ve kemferol (sırasıyla 0.411, 1.567, 0.619 ve 0.300 ug/g) kayda değer miktarda bulunmuştur. Ekstredeki toplam fenolik ve flavonoid içeriği MTÜ’de (sırasıyla 17.4±0.42 ve 16.6±0.23) ve MS’de (sırasıyla 5.7±0.17 ve 1.0±0.01) olarak bulundu. CCl₄ hasarına karşı MTÜ ve MS ekstreleri genel olarak karaciğer ve böbrek üzerinde iyileşme göstermezken; ekstreler mide dokusu MDA içeriğindeki azalış ve antioksidan parametrelerdeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05). Sonuç olarak; *M. neglectum* etanolik bitki ekstreleri önemli fitokimyasal bileşiklere sahip olduğu belirlendi. Ayrıca, *M. neglectum* CCl₄ kaynaklı mide bozuklukları tedavisinde koruyucu etkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, CCl₄, GC-MS, LC-MS/MS, *M. neglectum*, Sıçan.

ABSTRACT

EROĞLU A, Investigation of the Phytochemical Composition and Antioxidant Effects of Southern Grape Hyacinth (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) Plant Extract Against CCl₄-Induced Oxidative Stress in Rats, Van Y.Y.Ü. Institute of Health Sciences, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Discipline of Biochemistry, Master Thesis Proposal, Van, 2021. *Muscari neglectum* Guss. Ex Ten. plant has anti-inflammatory, anti-allergic, antimicrobial, antirheumatic and antioxidant properties because of its content of homoisoflavan, flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid etc. It is used as a diuretic, expectorant, against stomach disorders and as an aphrodisiac among the people. In this study, fatty acid analysis (GC-MS), phytochemical content analysis according to optimized 53 compounds (LC-MS/MS), total phenolic and total flavonoids were analyzed in the ethanolic extracts of *M. neglectum* aerial part (MAP) and bulb (MB) part. After the toxicity test, 42 *Wistar albino* female rats were divided into 7 groups. Control, *M. neglectum* aerial part (MAP) 400 mg/kg extract (MAP+400 mg/kg), *M. neglectum* bulb (MB) 400 mg/kg extract (MB+400 mg/kg), CCl₄ (0.5 ml olive oil+0.5 ml CCl₄ dilution 1 ml/kg, intraperitoneal), CCl₄+MAP 400 mg/kg, CCl₄+MB 400 mg/kg and CCl₄+Sliymarin 10 mg/kg oral (CCl₄+SLY) were groups. At the end of thirty-five days of treatment; serum biochemical parameters, antioxidant defense enzymes of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase enzyme activities, reduced glutathione levels and malondialdehyde (MDA) contents in liver, kidney and stomach tissues for the antioxidant role of *M. neglectum* extract were evaluated. According to the GC-MS fatty acid analysis, octadecadienoic and 9,12,15 octadecatrienoic fatty acids (25.66% and 21.50%, respectively) were found as major fatty acids in MAP ethanol extract whereas 9,12 octadecadienoic and octadecanoic acids (28.77% and 21.73%, respectively) in MB ethanol extract. According to LC-MS/MS results, quinic acid, fumaric acid, gentisic acid, caffeic acid, campherol and apigenin (1.726, 5.771, 0.138, 0.052, 0.035 and 0.092 µg/g, respectively) in MAP ethanol extract and quinic acid fumaric acid, caffeic acid and campherol (0.411, 1.567, 0.619 and 0.300 µg/g, respectively) in MB ethanol extract were found as significant amounts. The total phenolic and flavonoid contents in the extract were determined in MAP (17.4±0.42 and 16.6±0.23, respectively) and MB (5.7±0.17 and 1.0±0.01, respectively). While MAP and MB extracts generally did not show improvement on liver and kidney damage induced by CCl₄, extracts caused statistically significant decrease in MDA content and increase in antioxidant parameters (P<0.05) in stomach tissue. As a result; it was determined that *M. neglectum* ethanolic plant extracts have important phytochemical compounds. In addition, it was concluded that *M. neglectum* may have a protective effect in the treatment of gastric disorders induced by CCl₄.

Key Words: Antioxidant, CCl₄, GC-MS, LC-MS/MS, *M. neglectum*, Rat.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oksidatif Stres	3
2.2. Serbest Radikaller	4
2.2.1.Hidrojen peroksit (H_2O_2)	6
2.2.2. Hidroksil radikali ($\cdot OH$).....	7
2.2.3. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$).....	7
2.2.4. Singlet oksijen (1O_2)	8
2.3. Antioksidanlar	8
2.3.1. Redükte glutatyon (GSH)	10
2.3.2. Glutatyon peroksidaz (GPx)	11
2.3.3. Glutatyon S-transferaz (GST).....	11
2.3.4. Süperoksit dismutaz (SOD).....	12
2.4. Fenolik Bileşikler	12
2.4.1.Fenolik asitler	13
2.4.2.Flavonoitler.....	14
2.5. Karbon Tetraklorür (CCl_4)	15
2.6. Silymarin	18
2.7. Biyokimyasal Parametreler	20
2.7.1. Alanin aminotransferaz (ALT)	20

2.7.2. Aspartat aminotransferaz (AST).....	20
2.7.3. Laktat dehidrogenaz (LDH)	21
2.7.4. Kreatinin	22
2.7.5. Üre	22
2.7.6. Glukoz	23
2.7.7. Trigliserit (TG)	23
2.7.8. Total kolesterol (TC)	24
2.7.9. Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL_c)	24
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	25
2.8.1. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS)	26
2.9. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	27
2.10. Tıbbi Bitkiler.....	28
2.11. <i>Muscari</i> Mill.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Bitkisel Materyal	35
3.2. Deney Hayvanı (Sıçan)	35
3.3. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	35
3.4. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.5. Ekstraksiyon Hazırlığı.....	36
3.6. <i>İn vitro</i> Analizler	37
3.6.1. GC-MS analiz yöntemi.....	37
3.6.2. LC-MS/MS analiz yöntemi	37
3.6.3. Toplam fenolik içerik tayini	39
3.6.4. Toplam flavonoit içerik tayini	40
3.7. <i>İn vivo</i> Analizler	41
3.7.1. Toksisite testi ve dozların belirlenmesi	41
3.7.2. Deneysel muamele ve grupların oluşturulması	42
3.7.3. Kan ve doku örneklerinin alınması.....	42
3.7.4. Doku homojenizasyonu	42
3.7.5. Serum biyokimyasal parametreler	43
3.7.6. Total protein tayini	43

3.7.7. Malondialdehit (MDA) tayini.....	44
3.7.8. Redükte glutatyon (GSH) tayini.....	46
3.7.9. Glutatyon S-transferaz (GST) enzim tayini.....	47
3.7.10. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzim tayini	48
3.7.11. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim tayini	49
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	81
EKLER.....	82
Ek 1. Etik Kurul Kesin Sonuç Raporu	82
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu	83
Ek 3. LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri (Yılmaz, 2020)	84
Ek 4. LC-MS/MS Standart Fenolik Bileşikler Kromatogramı (Yılmaz, 2020)	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
ABTS	: Troloks eşiti antioksidan kapasite
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	: Alüminyum nitrat
ALS	: Amniyotrofik Lateral Skleroz
ALT	: Alanin aminotransferaz
APG III	: Angiosperm Phylogeny Group
AST	: Aspartat aminotransferaz
BHA	: Bütil hidroksianisol
BHT	: Bütil hidroksi toluen
BSA	: Sığır serum albümini
$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	: Kersetin
$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	: Silymarin
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$	: Sodyum sitrat
$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	: Gallik asit
CAT	: Katalaz
CCl_3	: Triklorometil
CCl_3O_2	: Triklormetil peroksil
CCl_4	: Karbontetraklorür
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$	: Potasyum asetat
CHA	: Canlı hayvan ağırlığı
Co	: Kobalt
CP	: <i>Cerotonia siliqua</i> L.
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
CuSO_4	: Bakır sülfat
dL	: Desilitre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2.-Difenil-1-pikrihidrazil
DTNB	: 5-5'-ditiobis 2- nitrobenzoik asit

EC	: Enzim kodu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FCR	: Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi
Fe	: Demir
FeSO₄.7H₂O	: Demir sülfat heptahidrat
FRAP	: Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç
G	: Gram
GAE	: Gallik asit
GC-FID	: Gaz kromatografi-alev iyonizasyon dedektörü
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₃PO₄	: Orto-fosforik asit
HCl	: Hidroklorik asit
HDL_c	: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol
HO·	: Hidroksil radikali
HOCl	: Hipoklorit asit
IZ	: İnhibisyon bölgesi
i.p.	: İntraperitoneal
KE	: Kersetin
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LOOH	: Lipit hidroperoksit
m/z	: Kütle/yük
M	: Molar

MDA	: Malondialdehit
metHb	: Methemoglobin
μmol	: Mikromol
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mol/L	: Mol
Mn	: Manganez
Mo	: Molibden
MRM	: Çoklu reaksiyon görüntüleme
MS	: <i>Muscari neglectum</i> soğan
MTÜ	: <i>Muscari neglectum</i> toprak üstü
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ni	: Nikel
Nm	: Nanometre
Nmol	: Nanomol
NO[•]	: Nitrik oksit
NO₂[•]	: Azot dioksit
O₂	: Moleküler oksijen
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
O₂^{•-}	: Süperoksit
O₃	: Ozon
ONOO⁻	: Peroksinitrit

°C	: Santigrat derece
PA	: <i>Platanus orientalis</i>
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PG	: Propil gallat
RNA	: Ribonükleik asid
RNS	: Reaktif azot türleri
RO·	: Alkoksil radikali
ROO·	: Peroksil radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SGOT	: Serum glutamik oksaloasetik transaminaz
SGPT	: Serum glutamik-piruvik transaminaz
SLY	: Silymarin
SO	: Sığla yağı
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAA	: Tiyoasetamid
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBHQ	: Tersiyer butilhidrokinon
TC	: Total kolesterol
TCA	: Trikloro asetik asit
TG	: Trigliserit
TIC	: Toplam iyon kromatogramı
TİTCK	: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
Tris	: Hidroksi metil amino metan
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi
UV/VIS	: Ultraviyole/görünür ışık
VANF	: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryumu
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi
WHO	: World Health Organisation
Zn	: Çinko

ΔA	: Absorbans değışimi
ΔOD	: Zamana göre absorbans değışimi
%	: Yüzde



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hidrojen peroksit molekül formülü.....	7
Şekil 2.2. Fenolik bileşiklerin molekül yapısı A-Hidroksibenzoikler, B-Hidroksisinnamikler (Shadidi ve Naczki, 1995).....	14
Şekil 2.3. Flavonoidlerin molekül yapısı.....	14
Şekil 2.4. CCl_4 'ün, CCl_3O_2^- 'e dönüşmesi.....	15
Şekil 2.5. <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn ve Silymarinin molekül yapısı	18
Şekil 2.6. Silibin, silidianin ve silikristinin molekül yapısı (Fraschini ve ark., 2002)	18
Şekil 2.7. <i>M. neglectum</i>	30
Şekil 3.1. Toplam fenolik tayini için gallik asit standart eğrisi.....	39
Şekil 3.2. Toplam flavonoid tayini için kersetin standart eğrisi.....	40
Şekil 3.3. Protein standart eğrisi.....	44
Şekil 3.4. MDA standart eğrisi	45
Şekil 3.5. GSH standart eğrisi	46
Şekil 3.6. SOD standart eğrisi	50
Şekil 4.1. <i>M. neglectum</i> toprak üstü etanolik ekstre GC-MS kromatogramı.....	52
Şekil 4.2. <i>M. neglectum</i> soğan etanolik ekstre GC-MS kromatogramı	53
Şekil 4.3. <i>M. neglectum</i> MTÜ etanol ekstresinin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) LC-MS/MS kromatogramı	56
Şekil 4.4. <i>M. neglectum</i> MS etanol ekstresinin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) LC-MS/MS kromatogramı	56
Şekil 4.5. Karaciğer, böbrek ve mide MDA içerikleri.....	59

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler (Uysal, 2018)	6
Tablo 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları	7
Tablo 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması	9
Tablo 3.1. Toplam fenolik içerik yöntemi	40
Tablo 3.2. Toplam flavonoit içerik yöntemi	41
Tablo 3.3. MDA yöntemi	45
Tablo 3.4. GSH yöntemi	47
Tablo 3.5. Karışımların küvete alınması ile GST ölçümün yapılması	48
Tablo 3.6. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları	49
Tablo 3.7. GPx ayraçların küvete pipetlenmesi	49
Tablo 3.8. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları	50
Tablo 3.9. Küvete SOD ayraçların pipetlenmesi	51
Tablo 4.1. <i>M. neglectum</i> toprak üstü etanolik ekstre GC-MS sonuçları	52
Tablo 4.2. <i>M. neglectum</i> soğan etanolik ekstre GC-MS sonuçları	53
Tablo 4.3. <i>M. neglectum</i> bitki kısımlarına ait toplam fenolik ve flavonoit içerikleri	54
Tablo 4.4. <i>M. neglectum</i> türünün MTÜ ve MS etanol ekstrelerindeki fitokimyasalların LC-MS/MS (mg analit/g ekstre) ile kantitatif taraması	55
Tablo 4.5. Deneysel gruplara ait ilk ve son hafta canlı hayvan ağırlıkları	57
Tablo 4.6. Deneysel gruplara ait biyokimyasal parametre düzeyleri	58
Tablo 4.7. Deneysel gruplara ait karaciğer, böbrek ve mide dokularındaki GSH düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri	61

1.GİRİŞ

Oksidatif stres, çeşitli ekzojen ve endojen faktörlerle üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) organizmada antioksidanlar tarafından bastırılmaması sonucu yaşlanma, doku ve organ fonksiyon kayıplarının ilerlemesi sonucu çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasıyla karakterize olan bir bozukluktur (Liguori ve ark., 2018).

Oksidatif strese neden olan serbest radikallerin ve oksidatif stresi engelleyen antioksidanların, organizmadaki redoks dengesine yönelik yapılan çalışmalar bir çok alanda gelişme kaydetmektedir (Sies ve ark., 2017).

İnsanların geçmişten günümüze hastalıkların tedavisini, bitkilerin çiçek, meyve, yaprak, gövde, kök ve kabuklarında araması bilim insanlarının bitki kökenli ilaçlara yönelmelerini sağlamıştır (Petrovska, 2012). Bitkilerde bulunan fitokimyasallar (fenolik asitler ve flavonoidler), antioksidan, antibakteriyel, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif ve kanser önleyici etkilerinden dolayı farmasötik ve tıbbi uygulamalarda bitkilerin önemini arttırmıştır (Tungmunthum ve ark., 2018). Fitokimyasal içeriklerin tayininde, total fenolik ve flavonoid yöntemleri (Vaghasiya ve ark., 2011), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK) (Mradu ve ark., 2012) ve Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) (Thomas ve ark., 2013) analizleri sıkça kullanılmaktadır.

Deney hayvanlarında, CCl₄ (karbon tetraklorür) (Doğan ve ark., 2018), etil alkol (Bati ve ark., 2015), siklofosfamid (Gedikli ve Şengül, 2019) ve tiyoasetamid (Kocaman ve Dabak, 2015) gibi birçok kimyasal, oksidatif stres oluşturma modellerinde kullanılmaktadır. Daha önce yapılmış çalışmalarda CCl₄'ün, hücre fonksiyonlarını bozarak karaciğer hasarına ve nekrozuna neden olduğu, organizmadaki serbest radikallerin artmasını tetiklediği ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sistemindeki dengeyi bozduğu rapor edilmiştir (Mahmoodzadeh ve ark., 2017). Ayrıca CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan deneylerde, CCl₄'ün sadece karaciğerde değil böbrek, dalak ve akciğer gibi dokularda da lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarı oluşturabileceği belirtilmiştir (Doğan ve ark., 2018).

Bitkiler geçmişten günümüze hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde geleneksel ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Shakya, 2016). Dünyada 374.000 bitki türü bulunmaktadır (Christenhusz ve Byng, 2016). Bu türlerden 20.000-70.000 arası türün tıbbi amaçlı kullanımının olduğu rapor edilmiştir (Schippmann, 2006; Arslan ve ark., 2015). Türkiye’de şimdiye kadar 12.000 civarında taksonun olduğu ve bunlardan yaklaşık 3649’unun Türkiye’ye endemik taksonlar olduğu belirtilmiştir (Şenkul ve Kaya, 2017).

Muscari neglectum iyi drene edilmiş, zayıf asit topraklarda doğal olarak yetişen ve bahar mevsiminde menekşe mavisi çiçekler açan çok yıllık soğanlı bir bitkidir. Çeşitli medeniyetlerde, *M. neglectum* bitkisinin hem toprak üstü hem de soğan kısımları yemeklerde (Mahboubi ve Taghizadeh, 2016; Lim, 2014; Uğurlu ve Seçmen, 2008), boya sanayisinde (Dmirici Kayıran ve Eroğlu Özkan, 2017) ve İran’da “Nevruz” bayramında yumurtaları boyama gibi etkinliklerde kullanımı vardır (Guarrera, 2006). Bitki yapısında bulunan flavonoit, alkaloit, terpenoit ve steroit (Nasrabadi ve ark., 2013) gibi bileşiklerin pektoral uyarıcı, antienflamatuvar, antialerjik ve afrodizyak etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Usher, 1974). *M. neglectum*’un içerdiği uçucu yağ asitleri (Eroğlu Özkan ve ark., 2018a) ve çeşitli fenolik bileşiklerin antimikrobiyal ve antioksidan rolü bulunmaktadır (Sanei ve ark., 2021; Nasrabadi ve ark., 2013). *M. neglectum* ampullerinde bulunan homoizoflavonoitlerin (Barone, 1988), antienflamatuvar, antikanser, östrojenik, antiöstrojenik ve anjiyoprotektif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Jiang ve ark., 2007).

Bu çalışmada CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda, *M. neglectum* bitkisinin karaciğer, böbrek ve mide dokuları üzerindeki olası koruyucu ve toksik etkilerinin belirlenmesi ve *M. neglectum* bitkisinde var olan etken maddelerin, uçucu bileşiklerin ve total fenolik ile total flavonoit miktarlarının tayini amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Çeşitli ekzojen ve endojen faktörlerle hücrel metabolizmada oluşan ROS artışını detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulmasına oksidatif stres denir. Bu dengenin oksidanlar lehine devam etmesi membranların, proteinlerin ve nükleik asitlerin zarar görmesine ve çeşitli hastalıkların oluşmasında önemli rol oynar (Doğan, 2018a).

Başka bir ifade ile oksidatif stres, organizmada bulunan veya dışardan çeşitli faktörler ile alınabilen ROS ve RNS'nin üretimi ile antioksidan savunma mekanizmalarının ROS/RNS tarafından bastırılmasıyla dokularda meydana gelen bozukluktur (Betteridge, 2000).

ROS ve RNS'nin oluşturduğu oksidatif stres, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların etkisiyle dengelenir (Valko ve ark., 2006)

Biyolojik sistem içerisinde metabolik yan ürün olarak üretilen süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen (1O_2) ROS olarak tanımlanmaktadır. ROS üretiminin artmasıyla organizmada protein, lipid ve nükleik asit gibi önemli hücrel yapılarda zararlı etkiler gelişir. Bu etkilerin ortaya çıkmasıyla bazı kronik hastalıkların başlangıcı veya ilerlemesi ile dejeneratif bozuklukların oluşması durumu söz konusu olmaktadır (Pizzino ve ark., 2017).

Oksidatif stres, hücre ve organizmadaki bazı proteinlerin yapılarını etkileyerek bu proteinlerin sinyal aktivitelerini uyarır veya inhibe eder. Bu durum hücrelerin redoks durumunu bozarak hücrelerde yangı, apoptoz veya proliferasyon ve malignan reaksiyon gibi durumlara neden olur (Ďuračková, 2010).

Oksidatif strese neden olan ROS/RNS, organizmada lipitlere doğrudan zarar verebilmektedir. Lipitlere en çok zarar veren en yaygın ROS, $HO^{\cdot}$ ve en yaygın ROS kaynağı H_2O_2 . $HO^{\cdot}$ ve H_2O_2 'nin aşırı üretilmesiyle hücre zarı lipid peroksidasyon yoluyla yıkıma uğrar. Bu reaksiyon sonucunda malondialdehit (MDA) ile sitotoksik ve mutajenik maddeler hücre içinde şekillenebilmektedir (Ayala ve ark., 2014).

DNA'nın oksidatif yıkımı, DNA'da farklı yıkımlara ve mutasyonlara neden olabilmektedir. Aynı zamanda DNA dizilimlerini etkileyerek bazılarının değişmesine veya silinmesine de neden olmaktadır. Organizma, DNA'yı etkileyen bu reaksiyonlara antioksidan savunma sistemleri ile engel olmaya çalışmaktadır (Cadet ve Davies, 2017).

Organizmada meydana gelen oksidatif stresin, çok ağır hasarlar oluşturarak birçok hastalığı tetiklediği bilinmektedir. Oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıklar (Huntington, Parkinson, Alzheimer ve Myotrofik Lateral Skleroz), kardiyovasküler hastalıklar, enflamatuvar hastalıklar, diyabet, amfizem ve kanser gibi hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Aynı zamanda geri dönüşü olmayan biyolojik bir durum olan yaşlılık üzerinde de oksidatif stresin etkisinin olduğu bilinmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015).

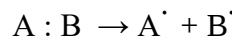
2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Eşleşmemiş her molekül belirli bir yörüngedeki tek başına olan elektrondur (Karabulut ve Gülay, 2016a). Elektron Spin Rezonansı'nın spektroskopik tekniği ile eşleşmemiş elektronların manyetik bir alana verdikleri tepki ile ortaya çıkan enerjiyi kaydederek, serbest radikallerin varlığı ve ölçümü yapılmaktadır (He ve ark., 2014).

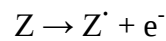
Serbest radikaller, yarı ömürleri çok kısa olan ve kararsız yapı gösteren moleküllerdir. Etraflarındaki diğer moleküllerle etkileşime girerek kararlı yapıya geçmeye çalışırlar (Uysal, 2018).

Bir serbest radikalin ortaya çıkması için üç yol bulunmaktadır:

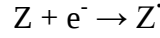
1. Kovalent bağlı molekülün homolitik bölünmesi ile oluşurlar. Bölünme sonucunda her bir yapıda ortak elektronlardan biri kalır.



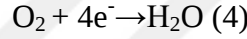
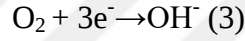
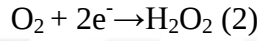
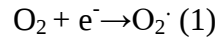
2. Bir molekülün tek bir elektron kaybetmesi sonucu ile oluşurlar.



3. Bir molekülün tek bir elektron alması sonucu oluşurlar (Halliwell ve Gutteridge, 2015).



Biyolojik sistemler içerisinde serbest radikallerin ana kaynağı oksijendir (O_2). Oksijenin eşleşmemiş elektronlar içeren türleri bulunmaktadır. Oksijen 4 basamaklı elektronlar halinde redükte olarak suya dönüşmektedir (Gürgöze ve ark., 2007; Ekici ve Sağdıç, 2008).



Serbest radikallerin birçoğu oksijen ve azot kaynaklı moleküllerdir. Bunların bir kısmı kendinden radikal özelliktedir. Diğerleri ise bazı reaksiyonlar sonucu radikal özellikteki moleküllere dönüşmektedir (Uysal, 2018). Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinin (nötrofil, makrofaj gibi) savunma mekanizmaları için ihtiyaç duyulsa da serbest radikaller oksidatif stresin en önemli kaynağını oluşturmaktadır (Kocabaş, 2008).

Organizmada meydana gelen metabolik olaylar sırasında oluştukları gibi bazı dış etkenler nedeniyle de oluşabilmektedirler. Serbest radikal reaksiyonlarını etkileyen pek çok ekzojen ve endojen faktör vardır. Ekzojen faktörler hem besin kaynaklı (yağların miktarı ve bileşimi, alkol, kalori miktarı, hayvansal ve bitkisel protein oranı, demir ve bakır miktarı, sebze ve meyve miktarı ve yiyeceklerin hazırlanma ve saklanma koşulları) hem de çevresel faktörlü (Sigara, çevre kirliliği, radyasyon v.b) olabilir. Endojen faktörler içinde ise sedanter yaşam, stres, yaşlanma, doku hasarı ve kronik hastalıklar sayılabilir. (Uysal, 2018).

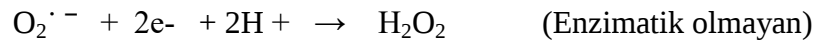
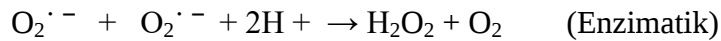
Tablo 2.1. Oksijen ve azot kaynaklı reaktif bileşikler (Uysal, 2018)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
• Hidroksil (HO$\cdot$) • Alkoksil (RO$\cdot$) • Peroksil (ROO$\cdot$) • Süperoksit (O$_2^{\cdot-}$) • Nitrik oksit (NO$\cdot$) • Azot dioksit (NO$_2^{\cdot}$)	• Hidrojen peroksit (H$_2$O$_2$) • Singlet oksijen (^{1}O$_2$) • Ozon (O$_3$) • Hipoklorit asit (HOCl) • Lipit hidroperoksit (LOOH) • Peroksinitrit (ONOO$^-$)

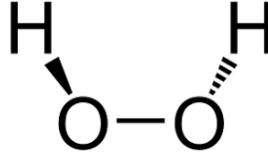
2.2.1.Hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$)

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikal kaynaklarından olan H $_2$ O $_2$, yapısında paylaşılmamış elektron bulundurmayan, radikal özelliği olmayan bir bileşiktir. Hidroksil radikalının demir (Fe) ve bakır (Cu) iyonları ile reaksiyona girmesiyle radikal özellik kazanmaktadır (Doğan, 2018a). H $_2$ O $_2$ katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler ile uzaklaştırılır (Phaniendra ve ark., 2015).

Hidrojen peroksitin O $_2$ 'ye bir ya da iki elektron ilavesiyle doğrudan oluşabildiği gibi, süperoksit radikallerinin dismutasyonu sonucunda da oluşabilir (Sezer ve Keskin, 2014).



Hidrojen peroksit, protein yıkımında rol oynadığı, göz lensine etki ettiği, lipid membranına kolayca nüfuz ettiği ve epitel hücre hasarına neden olduğu için *in vivo* ve *in vitro* modellerde oksidatif stresi indükleme amacıyla kullanılmaktadır (Bai ve ark., 2018).



Şekil 2.1. Hidrojen peroksit molekül formülü

2.2.2. Hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$)

Hidroksil radikali, serbest radikaller içerisinde en güçlü oksidan olarak bilinir. Yarı ömrü çok kısa olmakla birlikte oluştukları yerde biyolojik moleküllere saldırarak serbest radikallerin yayılmasına neden olurlar (Betteridge, 2000).

H_2O_2 , geçiş elementlerinin (Fe^{+2} , Cu^+ , Zn , Mn , Cr , Co , Ni , Mo) varlığında hidroksil radikaline dönüşür. Bu reaksiyon Fenton Reaksiyonu olarak adlandırılır. Ayrıca, süperoksit Fenton Reaksiyonu ile bağlantı kurarak metal iyonların tekrar kullanılmasını sağlar. Bu reaksiyon da Haber-Weiss Reaksiyonu olarak adlandırılır (Karabulut ve Gülay, 2016a).

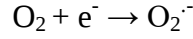
Tablo 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+/\text{Fe}^{+2} \longrightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^\cdot + \text{Cu}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$	Fenton Reaksiyonu
$\text{Cu}^{+2}/\text{Fe}^{+3} + \text{O}_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{Cu}^+/\text{Fe}^{+2} + \text{O}_2$	
$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$	Haber-Weiss Reaksiyonu

2.2.3. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali, yüksek oranda radikal olmayan ve doğrudan zarar vermeyen bir serbest radikal türüdür. O_2 molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. H_2O_2 oluşumuna kaynak sağlaması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasından dolayı oldukça önemlidir (Aslankoç ve ark., 2019).

Süperoksit radikali, çoğunlukla mitokondride, enerji dönüşümü sırasında açığa çıkan elektron kaçağının O₂ molekülünü süperoksit radikaline çevirmesiyle meydana gelmektedir. Parkinson gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Aslankoç ve ark., 2019; Valko ve ark., 2004).



2.2.4. Singlet oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen (¹O₂) ortaklaşmamış elektronu bulunmayan ve radikal olmayan serbest radikal türüdür (Perl-Treves ve Perl, 2002). İlk olarak 1924 yılında oksijenden daha reaktif bir form olarak belirlenmiştir (Ekici ve Sağdıç, 2008). DNA, protein ve lipitler ile reaksiyona girebilmektedir (Zhao, 2001).

Moleküler oksijen yüksek enerji ile uyarıldığı zaman eşleşmemiş elektronlardan biri kendi spininin tersi yönünde hareket ederek ya da bulunduğu orbitalden başka bir orbitale geçerek singlet oksijenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Anuk, 2018). Singlet oksijenin iki farklı formu bulunmaktadır. Zıt spinli eşleşmemiş elektronlar aynı yörüngede ise buna delta singlet oksijen, farklı yörüngede ise sigma singlet oksijen denilmektedir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

Süperoksit yüksek oranda elektromanyetik radyasyona maruz kaldığında moleküler oksijen ile birleşip singlet oksijeni oluşturabilmektedir (Ekici ve Sağdıç, 2008).

2.3. Antioksidanlar

Oksidatif strese sebep olan serbest radikallerin oluşumunu ve ortaya çıkardıkları etkileri engelleyen, azaltan veya ortadan, kaldıran organizmadaki savunma mekanizmalarını oluşturan moleküllere antioksidan denir (Altan ve ark., 2006).

Antioksidanlar hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan oksidasyon reaksiyonlarını engellemektedirler (Çelik ve ark., 2007).

Antioksidanların etki mekanizması 4 farklı şekilde olmaktadır:

1. Temizleme Etkisi: Enzimler tarafından, meydana gelen serbest radikalleri zayıf bir molekül haline dönüştürerek savunan mekanizmadır.

2. Baskılama Etkisi: Vitaminler ve flavonoidler tarafından, serbest radikallere bir hidrojen aktararak savunan mekanizmadır.

3. Onarma Etkisi: Serbest radikallerin oluşturduğu hasarı ortadan kaldırarak etki gösteren mekanizmadır.

4. Zincir Koparma Etkisi: E vitamini, hemoglobin ve seruloplazmin tarafından, ağır metaller şeklinde serbest radikalleri bağlayarak etkilerini engelleyen mekanizmadır (Memişoğulları, 2005).

Antioksidanlar yapılarına göre doğal ve sentetik, kaynaklarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak gruplara ayrılmaktadır (Altan ve ark., 2006; Çizmeci Can, 2019).

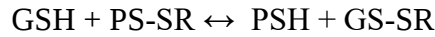
Tablo 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması

A.Doğal Antioksidanlar	B.Sentetik Antioksidanlar
1. Endojen Antioksidanlar	1. Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
1.1.Enzimatik Antioksidanlar	2. Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
• Süperoksit dismutaz (SOD)	3. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)
• Glutasyon peroksidaz (GPx)	4. Propil gallat (PG)
• Katalaz (CAT)	5. Troloks
• Glutasyon S-transferaz (GST)	6. N-asetilsistein
• Glutasyon redüktaz (GR)	7. Allopurinol
1.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	8. Probakol
• Glutasyon	9. Penisilamin
• Bilirubin	10. Deferoksamin
• Albümin	
• α -Lipoik asit	
• Melatonin	
• Ürik asit	
2. Ekzojen Antioksidanlar	
2.1.C ve E vitamini	
2.2.Karotenoitler ve Polifenoller	

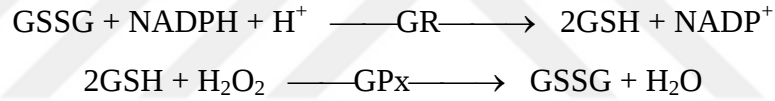
2.3.1. Redükte glutatyon (GSH)

L-glutamat, L-sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH, hücre için en önemli antioksidan moleküllerinden biridir. Proteinlerle disülfid değiş-tokuşuna girerek tiyol grupların indirgenmiş halde tutulmasını sağlayan bir tripeptittir (Gill ve ark., 2013).

GSH, büyük bir peptit yapıya sahip olup karaciğerde 5 mmol/L ve eritrositte 2 mmol/L konsantrasyonlarında bulunmaktadır (Baynes ve Dominiczak, 2009).



PS-SR: Bir proteinin oksitlenmiş, PSH: Bir proteinin indirgenmiş karma disülfididir. GS-SR, bir flavoprotein olan NADPH'ya bağımlı glutatyon redüktaz (GR) ile GSH'e çevrilir. Bu enzim için substrat okside glutatyon (GSSG)'dur. GSH, metHb reaksiyonunda oluşan H_2O_2 tarafından da GPx'in kataliziyle oksitlenebilmektedir (Anuk, 2018).



GSH'ın hücre içinde indirgenmiş olarak bulunması antioksidan etki göstermesi açısından oldukça önemlidir. Hücre içinde %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunmaktadır ve indirgenmiş formda tutulması pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır (Aksoy, 2002). Selenyum içeren GPx katalizörlüğünde H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürerek hücreleri ROS hasarından korur. Ancak selenyum düzeyinde azalma olduğunda GSH ve GPx etkisini kaybedebilmektedir (Sönmez, 2019).

GSH, oksidatif strese neden olan ajanlara karşı hücresel koruma sağlayan mekanizma oluşturur. Bu mekanizma ile serbest radikalleri temizler, peroksitleri azaltır ve toksik elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynar (Oestreicher ve Morgan, 2018).

2.3.2. Glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx (EC 1.11.1.9), dört alt birimden oluşan ve her birimi bir selenyum atomu içeren tetramerik yapıdaki antioksidan enzimdir (Margis ve ark., 2008; Karabulut ve Gülay, 2016b).

GSH'ın yükseltgenmesinde rol alırken H_2O_2 'yi suya dönüştürerek hemoglobinleri ve membran lipitlerini oksidasyona karşı korur (Memişoğulları, 2005).

Hücrelerdeki selenyum miktarının eksikliği ile beraber GPx'te ciddi azalmalar meydana gelebilir. GPx'in plazma formunun böbrekte sentezlendiği düşünülmektedir. En yüksek konsantrasyonu karaciğerde bulunur aynı zamanda bütün doku ve hücrelerde yayılım gösterir. Enzimin aktivitesi indirgenmiş glutasyon varlığına bağlıdır. İndirgenmiş glutasyonun yüksek tutulması glutasyon redüktazın aktivitesinin bir sonucudur (Young, 2001).

GPx iki farklı enzime ayrılabilir. Selenyuma bağlı GPx'ler H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin azaltılmasında rol oynar. Selenyuma bağlı olmayan GPx'ler ise organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eder (Cnubben ve ark., 2001).

2.3.3. Glutasyon S-transferaz (GST)

GST (EC 2.5.1.18), dimerik yapıda bulunan, canlı organizmalarda endojen olarak üretilen, detoksifikasyon reaksiyonlarında elektrofillere ve ROS'lara karşı savunma sağlayan bir enzim ailesidir (Musdal ve ark., 2012; Corticeiro ve ark., 2013). Ksenobiyotiklerin transformasyonunda önemli rol oynamaktadır (Koç ve Alptekin, 2014). GST izoenzimleri katalitik aktivitelerde yer almalarının yanı sıra çok geniş substratlı yapılara sahip olduklarından substrat olmayan ilaç ve hormonları ayırt edebilirler (Aköz ve ark., 2000).

GST'nin farklı izoformları sperm, seminal plazma ve erkek üreme organlarında bulunmaktadır. GST, birçok memeli hücre grubunda antioksidan olarak çalışsa da sperm GST'leri hücre detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Llavanera ve ark., 2019).

GST'ler GSH içerisinde yeni grupların eklenmesi ve çıkarılmasını ve bazı grupların yer değiştirmesini sağlayarak birçok bileşiğin GSH ile bağlanmasında rol oynamaktadır (Hollingworth ve Dong, 2008).

GST'nin bazı izoenzimleri GPx aktivitesi göstererek lipid hidroperoksitleri (LOOH) metabolizmasında görev almaktadır (Gürdöl, 2018).

2.3.4. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD (E.C. 1.15.1.1), antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturan enzimdir. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olan SOD, süperoksit (O_2^-) radikalinin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalizleyerek savunma sisteminde yer alır (Gürdöl, 2018).



SOD, asıl fizyolojik görevi süperoksit radikale karşı savunma oluşturduğundan dolayı, oksijen metabolize eden tüm hücrelerde var olduğu düşünülmektedir (Buettner, 2011).

SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD izoenzimlerine sahiptir. SOD'un aktif merkezinde bulunan ve metal kofaktöre sahip olan Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD izoenzimleri insanlarda bulunmaktadır. Cu,Zn-SOD izoenzimi hücre sitozolünde, Mn-SOD izoenzim tipi ise hücre mitokondrisinde bulunmaktadır. Yapısal olarak hiçbir benzerliği bulunmayan bu izoenzimler aynı tepkimeleri katalizlerler (Miao ve Clair, 2009; Siliğ ve ark., 2015). Fe-SOD izoenzimi ise prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunmaktadır (Anuk, 2018).

Yapılan çalışmalarda SOD izoenzimlerinin Down sendromu, Amniyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalıklarında, hücre farklılaşmasında, tümör oluşumunda, pulmoner toksisite ile uyarılan hipoksida ve vasküler kaynaklı hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Aslankoç ve ark., 2019). Ayrıca serbest radikallerin canlılarda oluşturduğu hasara karşı SOD enzimi katalaz enzimi ile birlikte çalışmaktadır (Süleyman ve ark., 2018).

2.4. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, yapılarındaki aromatik halkanın karbon atomları ile birleşmiş bir veya birkaç hidroksil grubuna sahip doğal bileşiklerdir. Hidroksil grup sayısı bir olanlar fenol, birden çok ise polifenol olarak adlandırılırlar (Mammadov, 2014).

Fenolik bileşikler, 8000'den fazla çeşidiyle bitkiler aleminde önemli derecede yayılış gösteren sekonder metabolitlerdir. Bitkiler parazit, patojen, radyasyon ve avcı saldırıya karşı yapılarındaki fenolik bileşikler ile savunma oluştururlar. Ayrıca bitkilerin renk ve tat oluşumlarına katkıda bulunurlar (Dai ve Mumper, 2010).

Fenolik bileşiklerin antidiyabetik, antiinflamatuar, antimikrobiyal, antialerjik, antiviral, antipatojenik ve antitrombotik gibi özellikleri ile birlikte kardiyovasküler ve nörodegeneratif hastalıklarda, osteoporoz ve kanserde koruyucu rolü olduğu belirtilmiştir (Macdougall, 2002; Scalbert ve ark., 2005; Kolaç ve ark., 2017).

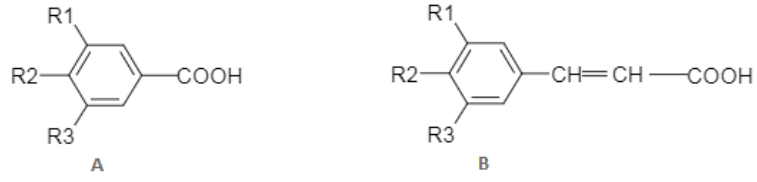
Fenolik bileşikler halkasal yapılarına ve yapı unsurlarına göre flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılırlar (D'Archivio ve ark., 2007).

2.4.1.Fenolik asitler

Fenolik asitler, serbest halde bulunmayan sebze ve meyvelerin yapısında yaygın olarak yer alan bileşenlerdir. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu bileşiklere OH ve -OCH₃ grupları bağlanarak diğer fenolik asit türevlerini oluştururlar (Yıldız ve Baysal, 2003).

Hidroksibenzoik asitler, bitkilerde eser miktarda bulunurlar veya hiç bulunmazlar. Ortak C₆-C₁ yapısına sahiptirler ve hidroksisinnamik asitlerin β-oksidasyonu ile oluşurlar. Bu gruba p-hidroksibenzoik, gallik, salisilik ve vanilik asit dahildir. Hidroksisinnamik asitler ise bitkilerde yaygın olarak bulunurken C₆-C₃ yapısına sahiptirler. Bu gruba kafeik, ferulik, p-kumarik ve o-kumarik asit dahildir (Kolaç ve ark., 2017).

Fenolik asitler, bitkilerde ortam koşullarına bağlı olarak oluşan strese karşı, bitkilerin savunma sistemini harekete geçirerek toleranslarını artırır. Bunun yanı sıra güçlü antioksidan yapılarından dolayı insan beslenme ve sağlığı üzerine de önemli katkıları bulunmaktadır (Turfan ve ark., 2016).



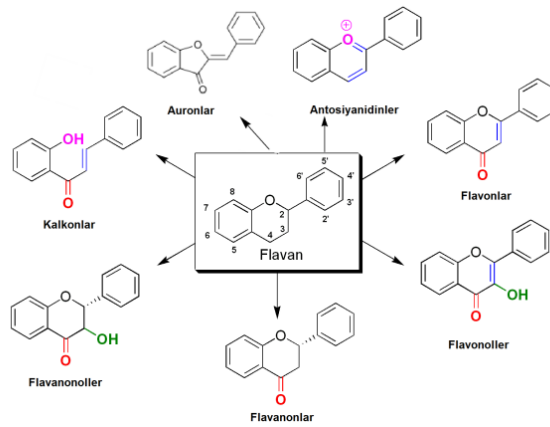
Şekil 2.2 Fenolik bileşiklerin molekül yapısı A-Hidroksibenzoikler, B-Hidroksisinnamikler (Shadidi ve Naczki, 1995)

2.4.2.Flavonoitler

Günümüze kadar tanımlanmış 8000'den fazla fenolik bileşiğin yaklaşık 4000'ini flavonoitler oluşturmaktadır (D'Archivio ve ark., 2007). Düşük molekül ağırlığına sahip flavonoitler, $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ şeklinde on beş karbonlu, 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısındadırlar (Kahraman ve ark., 2002; Atıncı ve Kalkan, 2018).

Flavonoitler; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller (veya kateşinler), izoflavon, flavanonoller ve antosiyanidinler olmak üzere farklı alt gruplara ayrılmaktadır (Tsao ve Yang, 2003). Bu gruplar arasındaki farklar, yapılarındaki hidroksil grupların sayısı, doymamışlık derecesi ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyi ile ilişkilendirilmiştir (Kumar ve Pandey, 2013).

Flavonoitlerin güçlü antioksidan özellikleri sayesinde yapılarındaki aromatik heterosiklik ve çoklu doymamış bağların varlığıyla sağlam bir kimyasal yapı gösterirler ve hidroksil gruplarının hidrojen vererek redoks reaksiyonlara katılmasıyla serbest radikal öldürücü etki gösterirler. Ayrıca lipid peroksidasyonunu kısıtlayıcı etkileri de bulunmaktadır (Artajo ve ark., 2006; Özay, 2015).



Şekil 2.3. Flavonoitlerin molekül yapısı

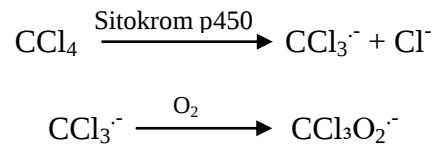
2.5. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

CCl₄; renksiz, kokulu, çabuk buharlaşan, yarılanma ömrü uzun, kararlı bir yapıya sahip apolar bir maddedir. CCl₄ endüstriyel fabrikalarda, evlerde, yangın söndürücülerde, kuru temizleme ve farmasötik üretim gibi alanlarda yaygın kullanılmaktadır. CCl₄ vücuda inhalasyon, deri ve sindirim yolu ile başta karaciğer, böbrek, akciğer, testis, beyin ve kas gibi pek çok organa zarar veren toksik bir maddedir (Hasar ve ark., 2020).

CCl₄, biyolojik olarak aktif değildir ve hedef hücrelerde rol alabilmesi için reaktif toksik metabolitlere çevrilmesi gerekmektedir (Vural, 2015).

CCl₄, hayvanlarda ve insanlarda hepatotoksititeye neden olduğu için toksitite modeli oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır. CCl₄, serbest radikal metabolitleri üretimi ile hücre hasar oluşturmaya başlar. Doymamış yağ asitleri ile reaksiyon oluşturarak lipid peroksidasyonuna, protein ve yağ asitleri ile kovalent bağlanarak hücre membranının bozulmasına neden olur. MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğu için hasarın belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Tekeli ve Bildik, 2013).

CCl₄, karaciğerde sitokrom p450 monooksijenaz sistemi ile hücre hasarını başlatır. CCl₄'ün toksik etkilerinin ortaya çıkmasında, karaciğerde biyotransformasyon sonucu oluşan triklorometil (CCl₃) radikali sorumludur. CCl₃ daha sonra oksijen ile tepkimeye girerek triklorometil peroksil (CCl₃O₂) radikalini oluşturur. CCl₃O₂ radikali hücre zar yapısını bozarak oluşan hasarda, birincil mekanizma olarak rol oynar. CCl₃O₂ radikali güçlü bir lipid peroksidasyonu temel başlatıcısıdır (Mercan, 2004).



Şekil 2.4. CCl₄'ün, CCl₃O₂'e dönüşmesi

Doğan (2018b), CCl₄ ile oksidatif stres oluşturduğu sıçanlarda *Pholiota aurivella* (PA) etanolik liyofilize ekstresinin biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışmada; deney gruplarını kontrol, CCl₄, CCl₄ + PA (100 mg/kg, ekstre) ve CCl₄ + PA (500 mg/kg, ekstre) şeklinde oluşturmuştur. 4 hafta süren deney süresince CCl₄ ve CCl₄ + PA gruplarına haftada iki kez intraperitoneal yolla 1 ml CCl₄/zeytinyağı karışımı vermiştir. Deney sonucunda yapılan bazı biyokimyasal parametreler ve hematolojik parametreler ile CCl₄ ve CCl₄+PA ekstresi uygulanan gruplarda GSH düzeyinin kontrol grubuna göre ve CCl₄ grubundaki GPx düzeyinin kontrol ve CCl₄+PA gruplarına göre önemli oranda düşüş gösterdiğini gözlemlemiştir. Eritrosit fragilitesi çalışmasında CCl₄ ve CCl₄+PA gruplarında kontrol grubuna göre artış olduğunu ve CCl₄ grubunda bazı hematolojik parametrelerde düşüş gösterdiğini ancak Kırmızı Kan Hücreleri Dağılım Genişliği (RDW)'nde artış olduğunu gözlemlemiştir. Sonuç olarak CCl₄'ün toksitesine rağmen PA için net bir şey söylenemeyeceğini ancak PA'nın hemolize neden olduğu için zararlı olabileceğini ve tüketiminde dikkat edilmesi gerektiğini açıklamıştır.

Suzek ve ark. (2016), CCl₄ ile oksidatif stres oluşturdukları sıçanlarda *Liquidambar orientalis* Mill (Hamamelidaceae) ağacından elde ettikleri sıgla yağının (SO) koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Deney gruplarını kontrol, CCl₄, SO ve CCl₄+SO şeklinde oluşturmuşlardır. 50 gün süren deney süresince CCl₄ ve CCl₄+SO gruplarına haftada iki kez intraperitoneal yolla 1 mL zeytinyağı/CCl₄ karışımı vermişlerdir. Deney sonucunda yapılan bazı biyokimyasal parametreler ve histopatolojik çalışmalar ile CCl₄ grubunda karaciğer hasarı serum biyobelirteçlerinde kontrol grubuna göre artış, CCl₄ + SO grubunda ise CCl₄ grubuna göre belirgin bir düşüş gözlemlemiştir. Ayrıca SO'nun karaciğer koruyucu etkisini, CCl₄ grubunda oluşan dejeneratif değişikliklere karşı CCl₄+SO grubundaki normal histolojik bulgularla desteklemiştir. Sonuç olarak SO'nun CCl₄ toksitesine karşı antioksidan özellik göstererek koruyuculuğunu açıklamışlardır.

Suzek ve ark. (2017), CCl₄ ile oksidatif stres oluşturdukları sıçanlarda *Ceratonia siliqua* L. (CP) türünden elde ettikleri keçiboyuzu tohumlarının nefropati ve hepatotoksisiteye karşı antioksidan rolünü ve koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Deney gruplarını kontrol, CCl₄, CP ve CCl₄+CP şeklinde oluşturmuşlardır. 50 gün boyunca süren çalışmada CCl₄ ve CCl₄+CP gruplarına haftada iki kez

intraperitoneal yolla zeytinyağı/ CCl_4 karışımı ve CP grubuna toz halindeki tohumları %10'luk olarak vermişlerdir. Deney sonucunda yapılan bazı biyokimyasal parametreler ve histopatolojik çalışmalar ile CCl_4 grubunda karaciğer hasarı serum biyobelirteçlerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. CCl_4 +CP grubunda ise CCl_4 grubuna göre düşüş ve CP takviyesinin CCl_4 'e bağlı olarak indüklenen MDA ve antioksidan savunma sistemi bileşenlerini kontrole göre geri yüklediğini belirtmişlerdir. Ayrıca CP'nin karaciğer koruyucu etkisini, CCl_4 grubunda oluşan dejeneratif değişikliklere karşı CCl_4 +CP grubundaki normal histolojik bulgularla desteklemişlerdir. Sonuç olarak CP'nin CCl_4 toksitesine karşı diyet kaynaklı antioksidanlar kadar önemli bir özellik gösterdiğini açıklamışlardır.

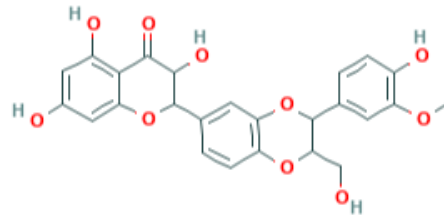
Mahmoud ve ark. (2019), 8 hafta boyunca CCl_4 maruz bıraktıkları sıçanlarda, bazı biyokimyasal parametreler ve histolojik çalışmalar (Masson'un trikrom boyaması) ile karaciğer fonksiyon parametrelerinin ve proenflamatuvar sitokinlerinin seviyelerinde artış gözlemlemişlerdir. Kumarin türevi bir bileşik olan umbelliferon maddesinin, CCl_4 'ün oluşturduğu bu hasara karşı koruyucu etkisini araştırarak pek çok biyokimyasal parametrede iyileşme gösterdiğini ve karaciğer fibrozuna karşı umut verici bir madde olabileceğini vurgulamışlardır.

Kocaman ve Dabak (2015), bazı hayvan modellerinde ve insan karaciğer hücrelerinde bir çok toksik maddenin (etanol, CCl_4 , tiyoasetamid (TAA), benzopiren, bakteriyel endotoksinler, viral ve toksik hepatit, alkol nedenli karaciğer hastalıkları gibi) serbest radikal mekanizması ile karaciğere hasar verici etkilerinin olduğunu, buna bağlı olarak silymarin (SLY)'in protein sentezini uyarması, lipid peroksidasyonunu baskılaması, GSH seviyesini hücre bazda arttırması, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltması ve temizlemesi etkileri ile karaciğerde oluşan bu tip hasarların önüne geçerek, SLY'nin antioksidan ve antifibrotik aktiviteye sahip olduğunu ve aynı zamanda toksin bağlayıcıları inhibe ederek hücre membran reseptörlerinde toksin bağlayıcı blokeri olarak da görev yaptığını belirtmişlerdir.

2.6. Silymarin

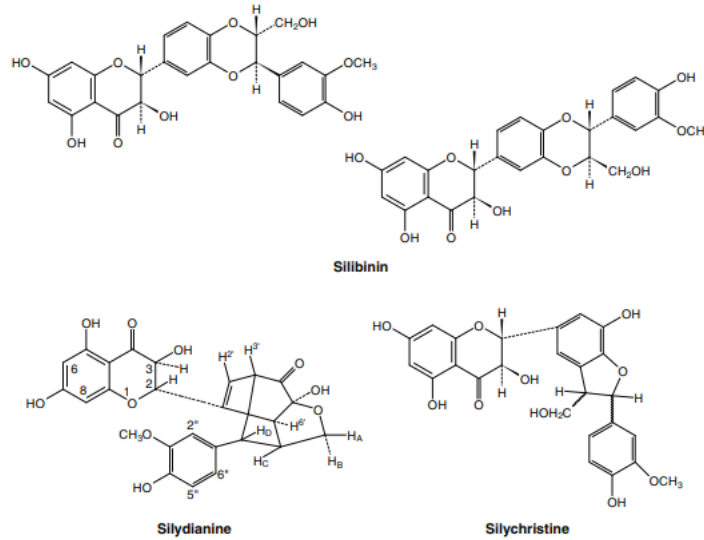
Silybum marianum (L.) Gaertn. (Meryemana diken, devedikeni), Asteraceae familyasına ait olan bir tıbbi bitkidir (TİTCK, 2020).

S. marianum tohumlarından elde edilen silymarinin ($C_{25}H_{22}O_{10}$) membran stabilize edici özelliklerinden dolayı karaciğer koruyucu rolü bulunmaktadır (Vargas-Mendoza ve ark., 2014).



Şekil 2.5. *Silybum marianum* L. Gaertn ve Silymarinin molekül yapısı

Silymarinin silibin, silidianin ve silikristin gibi üç farklı izomeri bulunmaktadır. En aktif bileşen olan silibin 1,4-dioksan halkasına sahiptir. Diğer izomerlerde bu halkanın olmaması silibin izomerinin daha etkili olduğunu düşündürmektedir (Ahmed ve ark., 2003).



Şekil 2.6. Silibin, silidianin ve silikristinin molekül yapısı (Fraschini ve ark., 2002)

Silymarinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte; glukuronidasyonu arttırarak glutatyonun tükenmesini önler ve glutatyonun intraselüler içeriğini düzenleyerek ROS/RNS süpürmesinde ve lipit peroksidasyonunu önlemede etkili olan bir antioksidandır. Karaciğer hücrelerine giren hepatotoksik ajanların zarar vermesini engelleyerek hücre membranı stabilizatörü ve permeablite düzenleyicisi olarak davranır. Karaciğer yenilenmesini hızlandırarak RNA polimerazın aktivitesini uyarır. Karaciğerde siroza neden olan kollajen fibrillerin artışına engel olur. İmmün sistemin bozulmasına neden olan toksik etkileri ortadan kaldırmaya yardım ederek immün sistemin yeniden düzenlenmesine yardımcı olur (Kocaman ve Dabak, 2015).

Silymarinin, etanol, parasetamol (asetaminofen) ve CCl₄ gibi ajanların hepatotoksitesini nötralize ettiği, lipit peroksidasyonunu şiddetlendiren tümör nekroz faktörlerini inhibe ettiği, akut viral ve toksik hepatitte, alkolle ilgili karaciğer hastalıklarında, *Amanita phalloides* mantarı zehirlenmelerinde ve psikotropik ilaçların neden olduğu hepatotoksik durumlarda serbest radikal süpürücü olarak rol oynadığı ve antihepatotoksik ajan olduğu belirtilmiştir (Fraschini ve ark., 2002).

Silymarinin, antiapoptotik, antiviral, antienflamatuvar, antifibrotik, antikarsinojenik ve antianjiyojenik özelliklere sahip olduğu, iyi tolere edilebildiği için kullanımının güvenli olduğu kanıtlanmıştır (Kocaman ve Dabak, 2015). Ayrıca silymarinin, diyabet ve diyabetin sebep olduğu komplikasyonları engelleyebileceği belirtilmiştir (Pradhan ve Girish, 2006; Vessal ve ark., 2010).

Silymarin yılan sokması, böcek ısırıklarının tedavisinde, toksin ve mantar zehirlenmelerinde, karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır (Ding ve ark., 2001).

Ghosh ve ark. (2016), karaciğer toksini olarak bilinen TAA'e maruz kalmış fareler üzerinde yaptıkları histolojik çalışmada, biyolojik ve farmakolojik etkilere sahip olan silymarinin (SLY) antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkisini kanıtlamışlardır. Fareler üzerinde yaptıkları bu çalışmada kontrol, TAA, SLY ve TAA+SLY gruplarını oluşturmuşlardır. DNA parçalanma analizi, kolajen boyama ve histolojik çalışmalar ile TAA grubunda TAA'nın reaktif oksijen türleri üreterek oksidatif stres oluşturduğu ve aynı zamanda karaciğer ve böbrek hücrelerinde apoptozu

indüklediğini belirtmişlerdir. Ancak, yine aynı çalışmalarla TAA+SLY grubunda SLY'nin, reaktif oksijen türlerini temizleyerek TAA'nın bütün bu zararlı etkilerini baskıladığını göstermişlerdir. Sonuç olarak SLY' nin karaciğer ve böbrekteki apoptotik yolları engelleyerek hücrelerin hayatta kalmasını sağlayıp, hepatik ve renal hasarı koruyucu etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

2.7. Biyokimyasal Parametreler

2.7.1. Alanin aminotransferaz (ALT)

Alanin aminotransferaz (ALT, E.C. 2.6.1.2.), transaminasyon reaksiyonunu katalize eden, “Serum glutamik-piruvik transaminaz (SGPT)” olarak da bilinen, bir amino grubunun L-alanin'den α -ketoglutarata transferinden, piruvat ve L-glutamat oluşturan tersinir reaksiyondan sorumlu olan bir enzimdir (Vutukuru ve ark., 2007; Fikry ve Ahmed, 2019).

ALT, karaciğere spesifik bir enzim olarak karaciğer sitoplazmasında bulunurken iskelet kası, böbrek, kalp ve eritrositlerde düşük yoğunlukta bulunabilir (Kolancı, 2009). ALT, klinik uygulamalarda kolayca elde edilebilen, ucuz ve rutin biyokimyasal parametredir (Liu ve ark., 2014). ALT, karaciğer hasarının belirlenmesinde önemli bir rol oynar ve etiyoloji ile birlikte aspartat aminotransferaz gibi diğer karaciğer enzim bulgularıyla birlikte değerlendirilir (Van Beek ve ark., 2013). Yüksek ALT seviyeleri yetişkin ve çocuklarda hiperlipidemi, diyabet ve obezite gibi bazı metabolik bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir (Karaphillis ve ark., 2017).

2.7.2. Aspartat aminotransferaz (AST)

Aspartat aminotransferaz (AST, E.C. 2.6.1.2), α -amino grubunun aspartattan ketoglutarik asit ve pürivik asite aktarılmasını sağlayarak sitrik asit döngüsünde rol oynayan, “Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz (SGOT)” olarak da bilinen bir enzimdir (Yemitan ve İzegbu, 2006; Kayacık ve Kalaycı, 2008).

AST, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, eritrosit, pankreas ve iskelet kasında bulunur (Arika ve ark., 2016). Sitoplazma ve mitokondrilerde yer alır (Fikry ve Ahmed,

2019). AST, klinik uygulamalarda rutin biyokimyasal parametre olarak kullanılmaktadır (Gürdöl, 2018). Kan dolaşımında bulunan AST miktarındaki yükseklik, hasar oluşan hücre sayısına karşılık gelir ve yükselme seviyesi hasarı takiben yapılan test süresine bağlıdır. Hücre hasarından sonra AST seviyesi 8 saat içinde yükselir ve 24-36 saatte zirveye ulaşır (Arika ve ark., 2016).

AST/ALT oranı kronik karaciğer hastalıklarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Brancaccio ve ark., 2010). Sirozda AST/ALT oranı 2'den büyük ve hepatitte ise bu oran 1'den küçüktür. Ayrıca AST, şok ve hipoksiye bağlı dolaşım yetmezliği ve miyokard enfarktüs gibi durumlarda da artış göstermektedir (Kolancı, 2009).

2.7.3. Laktat dehidrogenaz (LDH)

Laktat Dehidrogenaz (LDH, E.C. 1.1.1.27.), anaerobik koşullarda piruvatın laktata tersinir dönüştürülmesini katalize eden ve aynı zamanda nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz (NADH) ve NAD'nin birlikte dönüşümünü sağlayan bir enzimdir (Brancaccio ve ark., 2010; Miao ve ark., 2013).

LDH, LDH-A ve LDH-B olmak üzere iki ana alt birimden oluşur. LDH-A ve LDH-B, LDH'nin beş farklı izomerini (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 ve LDH5) oluşturur. LDH-A yoğun olarak iskelet kasında bulunur ve piruvat için yüksek bir afiniteye sahiptir. LDH-A alt birimini taşıyan LDH5, piruvatın laktata dönüşümünü destekleyerek NAD⁺ üretimini gerçekleştirir. LDH-B ise yoğun olarak kalp kasında bulunur ve mitokondride laktatın oksitlenebilen piruvata dönüşümünü gerçekleştirir (Ding ve ark., 2017).

LDH, tüm canlı türlerde geniş bir dağılıma sahip olmakla birlikte ağırlıklı olarak iskelet kası, kalp ve böbrekte; bağırsak, karaciğer, akciğer ve pankreasta ise daha az yoğunlukta bulunur (Center, 2007). Sitoplazmik bir enzim olması ve tüm hücrelerde bulunmasından dolayı LDH'nin, nekroz, apoptoz ve diğer hücre hasarlarında serumdaki seviyesinde artış gözlemlenir (Kumar ve ark., 2018).

2.7.4. Kreatinin

Kreatin (N-aminoiminometil-N-metilglisin, CREA), endojen olarak metiyoninden bir metil grubun, glisinden bir asetik grubun ve arjininden bir amit grubun aktarılmasıyla sentezlenen bir guanidin bileşiğidir. Karaciğer, böbrek ve pankreas tarafından sentezlenen CREA, kalp, iskelet kası ve beyin tarafından fosforillenerek yüksek enerjili fosfokreatin bileşiği ortaya çıkar (Negro ve ark., 2019). Dokunun ihtiyacı olan fosfat kullanıldıktan sonra geriye kalan molekül halkalaşma reaksiyonu göstererek kreatinini oluşturur (Gürdöl, 2018).

Serum kreatinin, böbrek hasarı için klinik uygulamalarda uygun ve güvenilir bir parametre olarak sıkça kullanılmaktadır. Glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nın belirlenmesinde kullanılan kreatininin, kas katabolizmasının bir ürünü olmasından dolayı bireyin kas kütlesi ile değişebileceği de mümkün olmaktadır (Delanaye ve ark., 2017). Kreatinin, kas kütlesi ve fiziksel performansın artması, anaerobik enerji kapasitesinin artırılması ve protein yıkımının azaltılması mekanizmalarına da etki etmektedir (Kreider ve Stout, 2021). Kan ve idrarda bulunan kreatinin, böbrek fonksiyon bozuklukları, kasların dejeneratif hastalıklarında ve tiroit bezinin düzgün çalışmadığı durumlarda tanı amaçlı kullanılmaktadır (Cánovas ve ark., 2019).

2.7.5. Üre

Üre, bir oksijen ve hidrojen bağı alıcısı olarak görev yapan, polar yapıda olan, suda çözünebilen bir moleküldür (Wang ve ark., 2014). Üre, 60 g/mol ağırlığına sahip protein ve azot metabolizmasının son ürünüdür (Lau ve Vaziri, 2017). Karaciğerde gerçekleşen üre döngüsü, amonyağın üreye dönüşümünü sağlayarak vücuttan atılımını gerçekleştirir (Lee ve ark., 2018). Karaciğerde sentezlenen üre, kan aracılığı ile böbreklere taşınarak glomerulus tarafından süzülür. Ürenin %40-60'ı toplayıcı kanallar aracılığıyla geri emilir (Bishop ve ark., 2013).

Kan üre seviyesi böbrek fonksiyon bozukluklarının ve yetersiz protein miktarının biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Pundir ve ark., 2019).

2.7.6. Glukoz

Glukoz, organizmada enerji rezervi ve metabolik yakıt olarak görev yapan ve redüktör grup olarak aldehit grubu içeren bir monosakkarittir (Galant ve ark., 2015).

Glukoz metabolizmasını, bağırsaktan karbonhidrat Emilimi, glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun direkt ve indirekt oksidasyonu, glikojenez, liponeojenez, glukozdan diğer monosakkaritlerin ve kompleks karbonhidratların oluşumu ve kan glukoz düzeyinin böbrek eşiği olan %160-180 mg'ı aştığı durumlarda idrarla glukozun atılımı (glukozüri) olayları oluşturmaktadır (Gürdöl, 2018).

Kan glukoz seviyesinin artması diyabetin önemli tanı belirtecidir (Buranasin ve ark., 2018). Hipergliseminin oluşmasıyla serbest radikal üretiminde artış meydana gelerek antioksidan savunma mekanizmasının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca lipit peroksidasyon ve ileri glikasyon son ürünlerinde de artışa yol açmaktadır (Shah ve ark., 2007).

2.7.7. Trigliserit (TG)

Trigliserit (TG), esterleştirilmiş üç yağ asidi ve 1 gliserol molekülü içeren, apolar ve esnek yapıya sahip bileşenlerdir. Bir yağ asidinin gliserolle esterleşmesi sonucu monoasilgliseroller; üç yağ asidi ile esterleşmesi sonucu triasilgliseroller yani TG'ler oluşur (Çetinkalp, 2017).

TG'ler, karaciğer hücresi ve adipoz dokunun endoplazmik retikulumun stoplazma yüzeyinde sentezlenerek yağ asitlerinin depolanmasını sağlarlar. TG'ler organizmada sıvı ortamların dışında bulunabilmeleri ve yüksek karbon içerikleriyle enerji depolanmasının önemli bir basamağını oluştururlar. TG hidrolizi sonucu açığa çıkan yağ asitleri, organizmanın enerji kaynağını karşılamada rol oynarlar (Çetinkalp, 2017). Ekzojen kaynaklı TG, bağırsakta üretilen şilomikronlar aracılığıyla taşınır. Endojen kaynaklı TG ise, hepatik olarak üretilmiş çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)'ler aracılığıyla taşınır (Laufs ve ark., 2020).

Kan TG seviyesi, 150 mg/dL normal olarak ve 150-999 mg/dL TG seviyesi ise yüksek olarak kabul edilir (Berglund ve ark., 2012). Kan TG seviyesindeki yükselme,

kardiyovasküler, böbrek ve metabolik hastalıklar, diyabet, hipotiroidi, şişmanlık, hamilelik ve bazı ilaçların kullanımı ile ilişkilendirilir (de Diego ve ark., 2019; Laufs ve ark., 2020).

2.7.8. Total kolesterol (TC)

Kolesterol, düzlemsel bir konformasyonda 27 karbonlu ve 4 kaynaşmış halkadan oluşan polisiklik bir lipit molekülüdür (Cortes ve ark., 2014). Kolesterol bir steroldür ve sterol çekirdeklerini asetil koenzim A'ya parçalayabilen bir enzim olmadığı için kolesterol, enerji kaynağı olarak kullanılamaz (Cortes ve ark., 2014; Narwal ve ark., 2019).

Kolesterol, hücre zarlarının yapısal bileşeni olmasının yanı sıra, safra asitleri, D vitamini ve steroid hormonlarının öncüsü olarak organizmada hayati bir öneme sahiptir (Morgan ve ark., 2016).

Kolesterol, hidrofobik bir yapıya sahip olmasından dolayı suda çözünmez ve emilimi için önce çözünmesi gerekmektedir. Ekzojen kaynaklı kolesterol emiliminin ilk basamağı, proksimal bağırsak lümeninde çözünmesiyle başlar. Karaciğer tarafından sentezlenen safra önce safra kesesinde depolanır, daha sonra safra kanalına geçerek Oddi sfinkterinden bağırsağa geçer ve emilimi sağlar. Dolaşımdaki lipoproteinlerden kolesterolün alımı ise karaciğerdeki hücreler tarafından gerçekleştirilir (de Boer ve ark., 2018). Besinle alınan kolesterol ortalama 200-3000 mg/gün iken, endojen kaynaklı sentezlenen kolesterol ise 1 g/gün'dür (Gürdöl, 2018).

Serum kolesterol seviyesinin, 200 mg/dL'den düşük olması normal kabul edilirken, 240 mg/dL'den fazla olması yüksek kabul edilir (Bui ve Park, 2016). Serum kolesterol seviyesi, diyabet, hipotiridizm, kardiyovasküler, karaciğer ve böbrek hastalıklarının tanısında önemli rol oynamaktadır (Narwal ve ark., 2019).

2.7.9. Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL_c)

Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL_c), plazma lipoproteinler arasında 5-17 nm çapındaki en küçük ve 1.063–1.210 kg/L'de en yoğun olan, ana proteini

apolipoproteini karaciğer ve ince bağırsak tarafından sentezlenen bir lipoprotein türüdür (März ve ark., 2017).

Organizmadaki fazla kolesterolün periferik dokulardan karaciğere taşınımı esnasında rol oynayan HDL_c partikülleri, antiaterojenik etki sergilemektedir (Weissglas-Volkov ve Pajukanta, 2010).

Serum HDL_c seviyesi erkeklerde 40 mg/dL, kadınlarda ise 50 mg/dL olarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2017).

HDL_c eksikliği koroner kalp hastalıklarında majör risk faktörüdür (Rohatgi ve ark., 2014). HDL_c ile koroner kalp hastalıkları arasındaki söz konusu ters ilişki, HDL_c'nin artmasıyla koroner kalp rahatsızlıklarının azalması şeklinde açıklanmaktadır (Rader ve Tall, 2012). Ayrıca HDL_c düşüklüğü tip 2 diyabet, kanser, inme ve bazı enflamatuvar hastalıklarda da etkili olabilmektedir (Pirillo ve ark., 2015).

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Bir karışımın gözenekli (adsorban veya sabit faz) bir ortamda hareketli bir çözünün (hareketli faz) etkisiyle, karışımında bulunan bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre farklı hareketlerle birbirinden çözünerek ayrılması işlemlerine kromatografi denir (Eser ve Dinçel, 2018).

Bir sıvı içerisindeki çözünmüş ve ayrılacak bileşikler, kolonun içinde katı bir destek üzerindeki sabit faz ile çeşitli etkileşimler oluşturarak farklı hızlarda ilerleyerek ve farklı zamanlarda terk ederek birbirinden ayrılırlar. Taşıyıcı faz olarak kullanılan sıvılar, kolona pompalar yardımıyla basıldığında yüksek akış hızı sağlayarak bileşiklerin birbirinden ayrılmasını daha kısa sürede tamamlanmasını sağlarlar. Kolonun ucuna bağlanan bir dedektör yardımıyla kolondan ayrılan bileşikler miktarlarıyla birlikte tespit edilip kaydedilir. Bu tarz yüksek hızda yapılan sıvı kromatografi sistemine YPSK denir (Yıldız, 2014).

YPSK, 1980'li yıllardan itibaren en yaygın kullanılan analitik tekniklerden biri olan kromatografi türüdür. Sıcaklığa duyarlı olan ve dayanıklı olmayan uçucu bileşiklerin analizinde sonuç alma açısından kolaylık sağlar (Yavaş, 2019).

Standart YPSK sistemleri hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon (sabit faz), dedektör ve atık rezervuarı olmak üzere 6 bölümden oluşmaktadır. Hareketli faz rezervuarı, kullanılan hareketli fazın konulduğu haznedir. Pompa, yüksek basınç ile mobil fazın YPSK sistemi içerisinde hareketini sağlayarak akış hızını ve basınç değerini ayarlar. Enjektör, sabit faz öncesinde mobil fazın enjekte edilmesinde kullanılır. Kolon, kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre bileşenlerin ayrılmasını sağlar. Son olarak dedektör ise ayrılan bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılmasını sağlar (Çetinkaya, 2014; Yavaş, 2019).

2.8.1. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS), kütle dedektörünün kullanılmasıyla çalışma kolaylığı ve tam sonuçlar vermesi nedeniyle kullanılan sıvı kromatografi temelli yöntemdir. LC-MS/MS, YPSK cihazının bir alt türüdür ve kütle spektrometresinin varlığıyla farklı bir cihaz olarak kullanılmaktadır (Eser ve Dinçel, 2018).

LC-MS/MS cihazı kütle spektrumu, iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör sistemi olmak üzere 4 bölümden oluşur (Öncü, 2016).

Kütle spektrometresi, elektriksel veya manyetik bir alanda hareket eden bileşenleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer bileşenlerden ayırt eder. Moleküller, iyonlara (+ veya - yüklü) dönüştürüldükten sonra gaz fazına geçilerek cihaza yüklenir. LC-MS/MS cihazında her molekül için m/z değeri ve retansiyon zamanı bulunur. Birçok molekül aynı m/z oranına sahiptir. Ancak moleküllerin aynı parçalanma iyonlarına sahip olması 1/10.000'dir (Eser ve Dinçel, 2018).

LC-MS/MS, organik ve inorganik moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde, bilinmeyen pek çok bileşiğin tanımlanmasında ve düşük konsantrasyondaki maddenin miktar tayinini yapmasından dolayı, kesin ve özgül sonuçlar vermesi nedeniyle sık kullanılan yöntemdir. (Eser ve Dinçel, 2018).

LC-MS/MS, klinik uygulamalarda (aminoasit metabolizması bozuklukları, organik asidemiler gibi hastalıkların tanısında), biyoteknoloji alanında (protein, peptit ve oligonükleotitler), adli tıp-toksikoloji analizlerinde (uyuşturucu ilaçlar, narkotikler, zehirler), farmasötik uygulamalarda (farmakokinetik ve ilaç çalışmalarında) ve çevre-gıda analizlerinde (pestisit ve metabolitler gibi) kullanılmaktadır (Eser ve Dinçel, 2018).

Tıbbi bitkiler yeni ilaç geliştirme açısından önemli biyoaktif maddeler içermektedir. Bu biyoaktif maddelerin tespiti ve yeni tıbbi bitki arayışları için de LC-MS/MS yöntemi kullanılmaktadır (Işık, 2020).

2.9. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS), iki farklı cihazın birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. GC-MS yöntemi, gaz kromatografisi ile bileşenleri gaz fazında yüksek verimle ayırmak ve kütle spektrometresi ile bilinen bileşenlerin doğrulanması ve bilinmeyen bileşenlerin kimlik tespiti esasına dayanmaktadır (Skoog ve ark., 2013).

Gaz kromatografisi ilk olarak 1952 yılında küçük karboksilli asit karışımının ayrımı ile kullanılmaya başlanmıştır. Kütle spektrometresi ilk olarak 1912 yılında oksijen, karbonmonoksit ve karbondioksit gibi bileşiklerin kütle spektrumlarının elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır (Özkan, 2017).

GC-MS cihazları 1958 yılında tanıtılmış ve ilk veri işleme 1968 yılında yapılmıştır (Özkan, 2017).

GC-MS yöntemiyle bileşikler sabit elektron voltajına maruz bırakılarak iyonize edilir. İyonize edilen bu bileşikler tekrarlanabilen, cihaza bağlı olmayan parçalanma modelleri üreterek veri tabanlarını oluştururlar (Garcia ve Barbas, 2011).

GC-MS analizleri, sadece uçucu bileşiklerin veya uçucu olmayan bileşiklerin türetme yoluyla uçucu hale getirilmesi sonucu, bu bileşiklerin tespiti işlemlerinde kullanılır (Garcia ve Barbas, 2011).

GC-MS yönteminin metabolomik analizlerde çoğunlukla kullanılmasının belirli avantajları bulunmaktadır. GC-MS, ham biyolojik malzeme miktarını azaltarak gazda bulunan bileşiklerin sıvı fazda daha iyi ayrılmasına olanak tanır ve veri tabanı sayesinde farklı alanlara (adli tıp, klinik, biyoteknoloji gibi) kolaylık sağlaması ile diğer metabolomik teknolojilere kıyasla düşük satın alma, çalıştırma ve onarma imkanı sağlar (Kanani ve ark., 2008).

2.10. Tıbbi Bitkiler

Geçmişten günümüze kadar insanlar hastalıkların tedavisinde (şeker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.), gıda tüketiminde, barınak ve giyim alanlarında bitkilere yönelmiştir. Tıbbi bitkilerin kullanımı çeşitli tıbbi sistemlere dayanarak yüzyıllar boyunca insanların birikimleri sonucu oluşturulmuştur (Sheng-Ji, 2001; Gurib-Fakim, 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Dünya çapında yaklaşık olarak 20.000 ile 70.000 arasında bitki türü tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Schippmann, 2006; Arslan ve ark., 2015).

Geleneksel tıp, birçok ülkede birinci basamak sağlık hizmetlerinde ve tamamlayıcı tıpta önemli oranda rol oynamaktadır. Geleneksel ilaçların dünya çapında kullanımı dünya nüfusunun %60'ına karşılık gelmektedir (WHO, 2021). Ayrıca bazı reçeteli ilaçların etken maddesini (vinblastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) bitkilerden elde edilen maddeler oluşturmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

1990'lı yıllardan sonra, doğal ürünlere olan talebin artmasıyla birlikte tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanları doğmuştur. Yapılan çalışmalarla tıbbi ve aromatik bitkiler piyasasının yıllık yaklaşık olarak 60 milyar dolar olduğu belirtilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Asya, Afrika ve Orta Doğu bölgelerindeki bazı ülkelere tıbbi ve aromatik bitkilere yönelim geliştirmekte olan ülkelere göre daha fazladır. Almanya, Avustralya, ABD ve Fransa gibi gelişmiş ülkelere tıbbi bitkilerin kullanımı oldukça azdır. Ancak Almanya, ABD, İngiltere ve Japonya tıbbi ve aromatik bitkilerin önemli ticaret merkezlerini oluşturmaktadır (Acıbuca ve Budak, 2018).

Ülkemizdeki tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı yaklaşık 350 adet civarındadır ve bunların 100'den fazlasının endüstriyel ticareti ve ihracatı yapılmaktadır (Aslan, 2019).

Geleneksel tıpta tıbbi ve aromatik bitkilerin kök, gövde ve bunların kabukları, çiçek, yaprak, lateks, tohum ve meyve kısımları kullanılmaktadır (Muthu ve ark., 2006).

Tıbbi ve aromatik bitkiler yapılarındaki antioksidan madde içerikleri ile antimikrobiyal, antifungal, antihelmintik ve serbest radikal süpürücü olarak etki göstermektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

2.11. *Muscari* Mill.

Asparagales ordosu 14 familya, yaklaşık 1053 cins ve 35.892 takson ile temsil edilmektedir. Dünya'daki en fazla takson sayısına sahip Orchidaceae familyası bu ordoya dahildir. Asparagales ordosu içerisinde yer alan Asparagaceae familyası 7 altfamilya, 114 cins ve yaklaşık 2900 tür ile temsil edilmektedir (Chase ve ark., 2009; Christenhusz ve Byng, 2016).

Muscari Mill. cinsi bilim dünyasına 1754 yılında İskoç kökenli İngiliz botanikçi Philip Miller (1691-1771) tarafından “*The Gardeners Dictionary*” isimli eserin 4. basımının 2. cildinde tanıtılmıştır.

Muscari cinsi, tür üzeri taksonomik kategorileri bakımından geçmişten beri tartışılan bir cins olmuştur. Cins ilk olarak Liliaceae familyası içerisinde konumlandırılmıştır (Lindley, 1846). Cronquist sınıflandırma sisteminde Liliaceae familyası içerisinde olan cins, Dahlgren sınıflandırma sisteminde Hyacinthaceae familyası içerisine alınmıştır (Cronquist, 1968; Dahlgren, 1980). *Muscari* cinsi Angiosperm Phylogeny Group (APG III) sınıflandırma sistemi ile birlikte Asparagaceae familyası içerisindeki Scilloideae alt familyasına dahil edilmiştir (APG III, 2009).

Muscari cinsi Akdeniz Havzası, Kafkaslar, Avrupa'nın ılıman bölgeleri, Kuzey Afrika, Güneybatı Asya boyunca yayılış göstermektedir (Speta, 1998; Jafari ve Maassoumi, 2011).

Farklı türlerine farklı isimler verilmekle birlikte, *Muscari* cinsi ülkemizde genellikle müşkürüm adıyla bilinmektedir (Baytop, 2007; Güner ve ark., 2012). Çiçek tomurcukları üzüme benzetildiğinden dolayı *Muscari* cinsi dünyada yaygın olarak üzüm sümbülü (grape hyacinth) adıyla bilinmektedir (Loewer, 2004).

Cins üyeleri genellikle ilkbahar çiçeklenmeli olup sadece bir türü sonbaharda çiçek açmaktadır Cinsin yayılış gösterdiği alanlar genellikle türlere göre değişiklik göstermekle birlikte; çayırliklar, stepler, karların eridiği bölgeler, taşlık kayalık alanlar, su kenarları, tuzcul alanlar, çeşitli orman altları gibi yerlerdir (Eroğlu, 2020).

Muscari cinsi ülkemizde 50 tür ile temsil edilmektedir. Bu 50 türden 33 tanesi endemiktir (Eker, 2021).

Muscari neglectum Guss. ex Ten. türünün Portekiz'den Pakistan'a kadar çok geniş bir coğrafyada yayılış gösterdiği belirtilmiştir (Karlén, 1984). Ülkemizde *M. neglectum* türü arap üzümü adı ile bilinmektedir (Güner ve ark., 2012).



Şekil 2.7. *M. neglectum*

M. neglectum soğanları ovoit globoz şekillidir ve genellikle küçük soğancıklar bulundurur. Soğan iç zarı parlak kahverengi, dış zarı koyu kahverengi renklidir. Yapraklar şeritsi şekilli, yatık veya dik, boru şeklinde katlanmış, uçları akut, kukuletalıdır. Çiçekler tomurcukta koyu mavi, uçları yeşil, olgun dönemde siyahımsı mor renklidir (Eroğlu, 2020).

M. neglectum türü Türkiye'de geniş alanlarda yayılış göstermekle birlikte halk arasında antiromatizmal, midevi, diüretik, ekspektoran olarak ve siğil tedavisinde kullanılmaktadır. Toprak üstü ve soğan kısımları infüzyon ve dekoksasyon halinde hazırlanarak tüketilmektedir. (Türker ve Usta, 2008; Karaköse ve Karaköse, 2017; Eroğlu Özkan ve ark., 2018a).

Demirci Kayıran ve Eroğlu Özkan (2017), yaptıkları çalışmada 77'si Türkiye'ye endemik olan 9 cins ve 140 taksonu temsil eden Hyacinthaceae familyasının geleneksel tıpta ve tıbbi uygulamalarda uzun yıllardır kullanıldığını belirtmişlerdir. Hyacinthaceae familyasından olan *M. neglectum*'un yaprakları gıda, boya eldesinde ve hayvan yiyeceğinde; çiçekleri tıbbi amaçlı siğil tedavisinde; soğanları gıda; meyvesi tıbbi amaçlı romatizmal hastalıklarda ve bitkinin tamamı boya sanayisinde yıllardır kullanıldığını bildirmişlerdir.

Mulholland ve ark. (2013), *M. neglectum*'un içeriğinde homoizo-flavanon olduğunu, soğan ve yapraklarından elde edilmiş etanol özleriyle yapılmış fitokimyasal ve *in vitro* çalışmalarda *Postia plasenta* ve *Trametes versicolor* gibi ahşap çürüklerinde antifungal etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Eroğlu Özkan ve ark. (2018a), Kahramanmaraş'tan topladıkları *M. neglectum*'un soğan ve toprak üstü kısımlarından elde ettikleri uçucu yağları Gaz Kromatografi-Alev İyonizasyon Dedektörü (GC-FID) ve Gaz Kromatografisi-Kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz ederek, soğanlardan elde edilen yağların %100' ünü içeren 17 bileşen ve toprak üstü kısımlardan elde edilen yağların %97.1'ini içeren 17 bileşen tespit etmişlerdir. Sonuçlar Nasrabadi ve ark.'nın (2013) yaptığı çalışmayla karşılaştırılmış ve tespit edilen bileşen farklılıklarının, coğrafi alan ve mevsimsel farklılıklardan oluştuğu belirtilmiştir. Bu uçucu yağların *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-pozitif), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* (Gram-negatif)'de antibakteriyel ve *Candida albicans*'da antifungal etkisi *in vitro* olarak çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, toprak üstü kısımlarından elde edilen yağların Gram-pozitif bakterilere orta düzeyde ve *S. epidermidis*'e karşı yüksek düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği; soğan yağının *E. faecalis* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel, *C. albicans*'a karşı orta düzeyde antifungal etki gösterdiği ve *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* ve *K. pneumoniae*'ye duyarlı olmadığı rapor edilmiştir.

Mahboubi ve Taghizadeh (2016), *M. neglectum*'un antioksidan ve antimikrobiyal aktivite düzeylerini belirlemek amacıyla *M. neglectum*'un çiçeklerinden elde ettikleri etanol ekstresinde toplam fenolik, flavonoit, monomerik antosiyanin içeriklerini ve gıda zehirleyici bazı mikroorganizmalarla antimikrobiyal aktivitesini farklı yöntemlerle incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, total fenolik içeriğini gallik asit standart eğrisine göre %18.2, total flavonoit içeriğini kersetin standart eğrisine göre %0.94 ve total antosiyanin içeriğini siyanidin-3-glukozit standart eğrisine göre %0.11 belirlemişlerdir. *M. neglectum* özütünün, *S. aureus*'a karşı inhibisyon bölgesi (IZ) göstermediğini ve *C. albicans* ve *Aspergillus niger*'e karşı küçük IZ gösterdiğini, *Shigella flexneri* ve *E. coli*'de diğerlerine oranla daha yüksek IZ gösterdiği ifade

etmişlerdir. Sonuç olarak gıda sanayisinde sentetik olanlara kıyasla doğal koruyucu ve renklendirici madde olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Eroğlu Özkan ve ark. (2018b), *M. neglectum*'dan elde ettikleri farklı ekstraların (etanol, su, hekzan, diklorometan ve metanol) antioksidan etkilerine ve sitotoksik aktivitelerine bakmışlardır. Antioksidan etki sonuçlarına göre, *M. neglectum*'un su ile hazırlanmış ekstresi diğer ekstralara göre daha güçlü pozitif kontrol olarak bütül hidroksi toluen (BHT) ve askorbik asit kullanılan 2.2.-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Soğanlardan elde edilen etanol ekstresi en yüksek Trolox Eşiti Antioksidan Kapasite (ABTS) (%27.88) katyon radikal temizleme aktivitesini ve toprak üstü kısımlarından elde edilen su ile hazırlanmış ekstre en güçlü metal şelatlama (%28.99) aktivitesini göstermiştir. Sitotoksik aktivite sonuçlarına göre, HeLa hücre hattındaki konsantrasyona bağlı olarak bazı ekstralar hücre sitotoksitesini indüklemişlerdir. *M. neglectum* soğan etanol ve metanol, toprak üstü diklorometan ve metanol ekstraları HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivite sergilemiştir. Bu ekstralar (soğan etanol ve metanol, toprak üstü diklorometan ve metanol) düşük konsantrasyonlarda bile NRK-52 hücre hatları için daha toksik etki göstermişlerdir. Sonuç olarak, soğan ve toprak üstü kısımların su ve hekzan ekstraları her iki hücre hattı için de sitotoksitite etki göstermemiştir.

Nasrabadi ve ark. (2013), *M. neglectum*'un hekzan ekstresinde fitokimyasal bileşikleri GC-MS yöntemiyle incelemişlerdir. *M. neglectum* yağı (2-etilhekzil) ftalat (18.6%), tribütietilstannan (10.1%), bis (klorofenil) sülfon (8.7%), giberellin (4.9%), 1,6,10- dodekatrien3-ol, 3,7,11-trimetil (3.3%) ile karakterize edilerek 32 adet biyoaktif fitokimyasal bileşik tanımlanmıştır. GC-MS sonuçlarına göre fitokimyasal bileşiklerden flavonoit, alkaloit, terpenoit ve steroit pozitif; saponin ve tanen negatif sonuçlar vermiştir.

Loizzo ve ark. (2010), *M. comosum*'un etanol ve *n*-hekzan ekstralarının antioksidan özellikleri, metal şelatlama aktivitesi ve karbonhidrat-hidrolize edici enzim inhibisyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Etanol ekstresinden elde edilen özütün total fenolik içeriği klorojenik asit standart eğrisine göre %56.6 mg ve total flavonoit içeriği kersetin standart eğrisine göre %23.4 mg olarak belirlenmiştir. *n*-Hekzan ekstresi GC-MS yöntemiyle ana bileşenler olarak yağ asitlerinin ve etil esterlerin, küçük

bileşenler olarak farklı aldehitler ve alkanların varlığını göstermiştir. Etanol ekstresinin 40.9 mg/ml'lik %50 inhibisyon (IC50) değeri veren yüksek konsantrasyonda en yüksek ferrik düşürücü gücüne sahip olmakla birlikte, α -amilaz (81.3) ve α -glukosidaz (112.8) için iyi bir hipoglisemik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Sonuç olarak *M. comosum* ampullerinden elde edilen ekstraların, karbonhidrat sindirim enzimlerinin inhibisyonu yoluyla antioksidan ve hipoglisemik aktivite varlığını göstererek kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Bokov ve Riethmüller (2020), insan sağlığı için önemli olan antosiyaninlerin, *M. neglectum* bitkisinin çiçek ampullerindeki varlığını ortaya çıkarmayı amaçlamışlardır. HPLC ve GC-MS yöntemlerini kullanarak *M. neglectum* çiçeklerinde petunidin, pelargonidin, delfinidin, malvidin gibi antosiyaninlerin varlığını kanıtlamışlardır.

Kenan ve ark. (2019), *M. neglectum*'un da dahil olduğu 12 bitki türünün metanol ekstresini elde ederek antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon yöntemini kullanarak çalışmışlardır. Sonuçlar inhibisyon bölgesindeki zon çaplarına göre değerlendirilmiştir. *M. neglectum*, *C. albicans* suşu üzerinde etkili olduğu ve 11 mm'lik bir zon oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre *M. neglectum*'un antifungal etki gösterdiği belirtilmiştir.

Bahmani ve Zargaran (2015), kullanılan veya yeni tıbbi bitkilerin tespitiyle etnofarmakolojik çalışmalara öncülük olması amacıyla İran'ın Urmiye kentinde baharat dükkanlarında çalışan geleneksel şifacılarla yaptıkları görüşmeler ve anket sonuçlarına göre üriner sistem taşlarına iyi gelen bitkileri tespit etmişlerdir. 47 çalışandan 35'inin katıldığı çalışma sonuçlarına göre *M. neglectum*'un antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve üriner sistem taşlarına etki gösterdiği belirtilmiştir.

Sanei ve ark. (2021), hastalıkların tedavisinde büyük etkileri olan bitkilerin sekonder bileşiklerini araştırmak amacıyla, İran'ın Kirmanşah kentindeki bazı bölgelerin florasını inceleyerek 10 farklı familya seçmişlerdir. Nisan'dan Eylül'e kadar farklı dönemlerde çiçeklenen bitkiler toplanarak metanol ekstresi elde edilmiştir. DPPH, demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), ABTS ve toplam antioksidan kapasite (TAC) yöntemleri kullanılarak antioksidan potansiyelleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *M. neglectum* TAC yönteminde kuru maddede 9.8 mg/g ile en yüksek antoksidan

potansiyeli gösteren bitki olmuştur. ABTS yönteminde %70.6 ve FRAP yönteminde kuru maddede 2.59 mg/g ile en yüksek antioksidan potansiyeli gösteren ikinci bitki olmuştur. DPPH yönteminde *M. neglectum* önemli derecede bir antioksidan potansiyeli göstermemiştir.

Mahomoodally ve ark. (2021), Türkiye’den elde ettikleri altı soğanlı bitki türünün (*M. neglectum*, *Crocus danfordiae* Maw., *Galanthus elwesii* Hook. f, *Iris stenophylla* Hausskn ex Baker, *Tulipa humilis* herb., *Hyacinthella acutiloba* K.Perss. & Wendelbo) metanol ekstrelerinin kimyasal bileşimlerini ve biyolojik özelliklerini kolorimetrik yöntemler ve LC-MS/MS yöntemleriyle araştırmışlardır. *M. neglectum* (çiçek ekstresi) ve *T. humilis* (çiçek ekstresi) bitkileri dışındaki türlerin yaprak özütlerinden en yüksek fenolik ve flavonoit içeriği elde etmişlerdir. *M. neglectum* da dahil olmak üzere tüm türler, anti-asetilkolinesteraz (1.77-2.53 mg GAE/g) ve tirozinaz (54.9-67.20 mg KE/g)’a karşı aktivite sergilemişlerdir. Butirilkolinesteraz’a karşı en yüksek aktiviteyi ise *M. neglectum* (2.99 mg GAE/g) sergilemiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile fito-tıp ve nutrasötiklerin geliştirilmesi için bu türlerin, biyolojik olarak aktif bileşiklere sahip potansiyel kaynak olabileceğini göstermişlerdir.

Uğurlu ve Seçmen (2008), 2001-2002 yıllarında Yunt Dağı’na bağlı seçilen köylerin sakinleri ile yaptıkları anket çalışmasıyla geleneksel tıpta, tıbbi amaçlı kullanılan bitkileri listelemişlerdir. Bu listede bulunan bitkilerden *M. neglectum*’un halk tarafından romatizma tedavisinde kullanıldığını belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, *M. neglectum* Guss. Ex Ten. bitkisine ait toprak üstü (MTÜ) ve soğan (MS) kısımlarına ait etanolik liyofilize ekstresinin hem *in vitro* (GC-MS, LC-MS/MS, toplam fenolik ve toplam flavonoit) analizleri hem de CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda bu ekstrenin serum biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkisine ek olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan rolü karaciğer, böbrek ve mide dokusu süpernatantlarında *in vivo* olarak ilk kez çalışılmıştır. Ayrıca, pozitif kontrol grubu olarak başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokular üzerinde koruyucu etki mekanizması iyi bilinen silymarin (10 mg/kg, oral) kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan *M. neglectum* bitkisinin toprak üstü kısımları ve soğanları (sürülmüş tarım arazisinden toplandı) 2020 yılı Nisan ayı Van'ın Tuşba ilçesi Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi kampüs alanından toplandı. Fen Fakültesi Botanik Anabilim Dalında görevli Araş. Gör. Dr. Hüseyin EROĞLU tarafından teşhis edildikten sonra 165199 nolu kayıt numarasıyla Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryum (VANF)'unda kayıt altına alındı. Toplanan örnekler toz, topraktan arındırıldı ve güneşten korunarak gölgede kurutuldu. Çalışma öncesi hazırlıkta, kuruyan bitki numuneleri, kaba toz haline getirildi ve çalışma zamanına kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildiler.

3.2. Deney Hayvanı (Sıçan)

Deneyisel çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen 2-3 aylık, 150-250 g ağırlığındaki 84 adet *Wistar albino* ırkı dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 25±2 °C'de, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda, standart plastik kaplarda *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı.

3.3. Analizlerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

WiseMix VM-10 vorteks, WISD WİSESTİR MSH-20A manyetik karıştırıcı, ALPHA-CHRIST 1-2 LDPLUS liyofilizatör, BUCHI (Interface I-300 Pro, Heating Bath B-300 Base, Vacuum Pump V-300, Recirculating Chiller F-305) evaporatör, ISOLab LS-EJ-320AB hassas terazi, NÜVE NF 1200R soğutmalı santrifüj, NÜVE NF 1200 santrifüj, JSWB-22T sıcak su banyosu, WTW İnolab pH-7110 pH metre, ARCHITECT 16200 Abbott park IL 60064 USA Otoanalizatör, SHİMADZU-NEXERA model UHPLC cihazına bağlı SHİMADZU LCMS-8040 model sıralı tandem kütle spektrometresi, 5975 Üç Eksen Detektörü Kütle spektrometresi ile donatılmış Agilent

Technologies 7890 model gaz kromatografi cihazı, Eppendorf plus mikropipet, Vestel derin dondurucu, Wisecryo difiriz (-80 °C), AE-S90- MD UV/VIS spektrofotometre, Ultrasonik homojenizatör (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany), Kross saf su cihazı, bitki öğütücü, falkon 50 mL plastik tüp, enjektör, eldiven, beher, EDTA'lı ve Biyokimya tüpleri, makas, neşter, kurutma kâğıdı.

3.4. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sodyum hidroksit (NaOH), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum klorür (NaCl), 1.1.3.3.tetraetoksipropan (MDA), Hidroksi metil amino metan (Tris), Demir II sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Askorbik asit, Tiyobarbitürik asit (TBA), Trikloro asetik asit (TCA), Sığır serum albumin (BSA), Etil alkol, Coomasie Blue G, Orto-fosforik asit (H_3PO_4), Redükte glutatyon (GSH), 2,4-Dinitroklorobenzen (CDNB), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), Sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), Süperoksit dismutaz (SOD) enzim kiti (Ransod, SD125), Glutatyon peroksidaz (GSHPx) enzim kiti (Ransel, RS504), Ketamin (%10 luk), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Folin-Ciocalteu reaktifi, Gallik asit ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), Potasyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$), Alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$), Kersetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$).

3.5. Ekstraksiyon Hazırlığı

Toz haline getirilen *M. neglectum* toprak üstü ve soğan örnekleri, ayrı ayrı 50 g tartılarak üzerine 1 L % 80'lik etil alkol ilave edildi. 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra bir tülbent yardımıyla süzüldü. Süzülen sıvı, kaba kurutma kâğıdından süzülerek evaporatör cihazında pekmezimsi bir kıvam alana kadar alkol uçuruldu. Elde edilen özüt 250 ml'lik erlenlere koyularak 45°'lik açıyla -80°C'de 24 saat donduruldu. Erlenler liyofilizatör cihazında 72 saat boyunca kurutularak %80 etanol ekstresi elde edildi.

3.6. *İn vitro* Analizler

3.6.1. GC-MS analiz yöntemi

M. neglectum toprak üstü ve soğan %80 etanol ekstrelerinin yağ asidi ve uçucu bileşen analizi GC-MS cihazı ile belirlenmiş yöntemle göre taranması esas alınarak Siirt Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı (Tüfekçi ve ark., 2018).

Ekstreler 100 mg tartıldıktan sonra üzerine 2 ml metanol eklendi ve vortekslendi. Ardından 2 ml hekzan eklendi ve vortekslendi. Son olarak 1 M potasyum hidroksit (KOH, metanol içerisinde çözünmüş) eklendi ve vortekslendi. Üst faz alındıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilip viallere koyuldu ve GC-MS analizi yapıldı (Tüfekçi ve ark., 2018).

Üç Eksen Detektörü 5975 model Kütle spektrometresi ile donatılmış, Agilent Technologies 7890 model gaz kromatografi üzerinde gerçekleştirildi. Analitik kolon olarak HP-5 ms kapiler kolon (30 m x 250 µm x 0.25 µm film kalınlığı, %5-fenilmetilpolisiloksan) kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk akış hızında ultra saf helyum ve 2 µL'lik split enjeksiyonlar kullanıldı. Elektron darbeli iyon kaynağı 70 eV şeklinde ayarlandı. Enjektör sıcaklığı 250°C; iyon kaynağı 250°C ve arayüz sıcaklığı 270°C olarak ayarlandı. Fırın sıcaklık programının başlangıç sıcaklığı 100°C olarak ayarlandı. Daha sonra sıcaklık 10 dk boyunca 100°C'de tutuldu ve 10°C/dk'lık bir hızda 200°C'ye yükseltildi. 200°C'de 10 dk tutulduktan sonra 25°C/dk hızda 270°C arasında 36 dakika tutuldu ve 270°C'de 20 dk tutularak çalışma süresi 84 dk olarak belirlendi (Tüfekçi ve ark., 2018).

Sonuçlar, NIST ve WİLEY arama veri tabanındakilerle karşılaştırılarak tanımlandı (Tüfekçi ve ark., 2018).

3.6.2. LC-MS/MS analiz yöntemi

M. neglectum toprak üstü kısımlarından ve soğanlarından elde edilen %80 etanol ekstrelerinin fitokimyasal içerik tanımlanması ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi (UHPLC) cihazı ile 53 fitokimyasalın oturtulmuş validasyon yöntemine

göre taranması esas alınarak Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı (Yılmaz, 2020).

Referans olarak kullanılan 53 fitokimyasal ve flavonoit olmayan bileşiklerin, flavonoit glikozitlerin ve flavonoit aglikonların miktar tayini için iç standart olarak kullanılan ferulik asit-D3, rutin-D3 ve kersetin-D3'ün ticari saf madde standartları kullanılarak stok çözeltiler hazırlandı (Yılmaz, 2020).

Kuru bitki ekstrelelere ferulik asit D3 (20 mg/L), rutin D3 (1 mg/L) ve kersetin D3 (5 mg/L) eklendi. Daha sonra metanol ile 1000 mg/L'ye seyreltildi. Son olarak 0.2 µm şırınga filtresinden süzülerek LC-MS/MS analizi yapıldı (Yılmaz, 2020).

Analiz için Shimadzu-Nexera model UHPLC cihazına bağlı tandem kütle spektrometresi kullanıldı. Kullanılan ters faz UHPLC sistemi, bir otoörnekleyici (SIL-30AC model), bir kolon fırını (CTO-10ASvp model), gradiyent pompa sistemi (LC-30AD model) ve bir degazer (DGU- 20A3R model) bileşenlerinden oluşturuldu. Kromatografik ayırım Agilent Poroshell 120 EC-C18 model (150 mm×2.1 mm, 2.7 µm) bir kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı. Elüsyon gradiyenti, mobil faz A (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit) ve mobil faz B (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit)'den oluşturuldu. Gradiyent elüsyon profili, %20-100 B (0-25 dk), %100 B (25-35 dk), %20 B (35-45 dk) şeklinde kullanıldı. Mobil faz akış hızı 0.5 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 5 µl olarak belirlendi (Yılmaz, 2020).

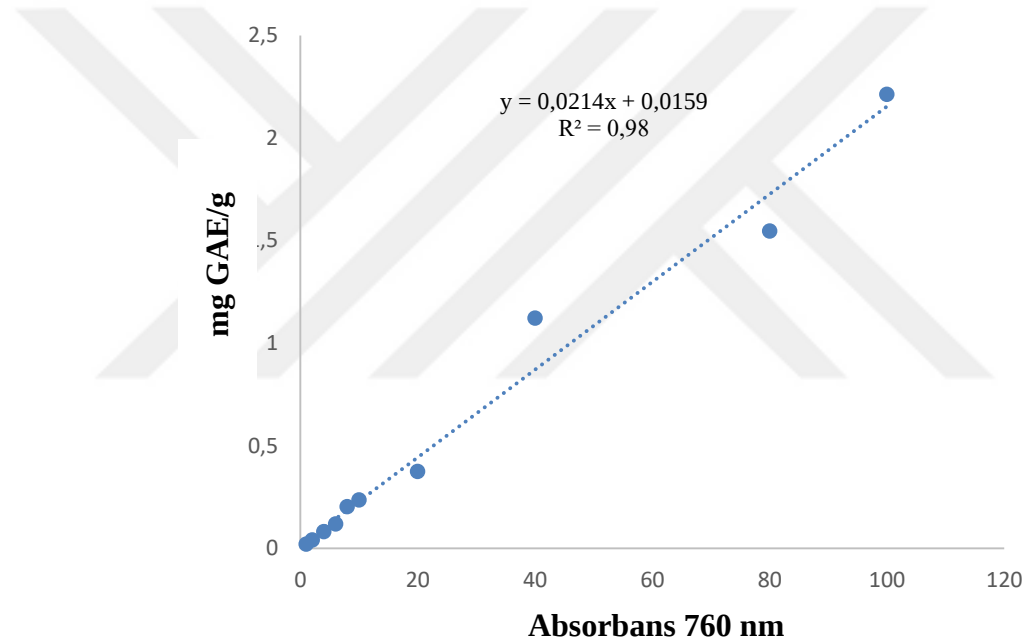
Kullanılan LC-MS/MS sisteminin kütle spektrometre dedeksiyonu için hem pozitif hem de negatif modda çalışan bir elektrosprey iyonlaşma kaynağı ile donanmış Shimadzu LCMS-8040 model sıralı kütle spektrometresi kullanıldı. LC-ESI-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) ile alındı ve işlendi. Fitokimyasalların miktar tayinlerinin tespiti için Çoklu Reaksiyon Görüntüleme (MRM) modu kullanıldı. MRM yöntemi, belirli ana iyon-parçalanma iyonu geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasalların seçici olarak tespit edilip miktarsal tayininin yapılması için optimize edildi. Optimum fitokimyasal fragmentasyonu ve arzulanan parçalanma iyonlarının maksimal geçişini elde etmek için çarpışma enerjileri optimize edildi. Uygulanan MS çalışma şartları, kurutucu gaz (N₂) akışı 15 L/dk; nebulizer gaz (N₂) akışı 3 L/dk; DL

sıcaklığı 250°C; heat block sıcaklığı 400°C ve arayüz sıcaklığı 350°C olarak belirlendi (Yılmaz, 2020).

Analiz sonuçları 53 fitokimyasal bileşik ve 3 iç standart bileşik validasyon parametre tablosuna (Ek 3.) ve kromatogramına (Ek 4.) göre belirlendi (Yılmaz, 2020).

3.6.3. Toplam fenolik içerik tayini

Toplam fenolik içeriği, Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asit standart eğrisine göre mg/g olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton, 1977).



Şekil 3.1. Toplam fenolik tayini için gallik asit standart eğrisi

Çözeltiler

1. %2'lik sodyum hidroksit (NaOH) Çözeltisi: 2 g NaOH tartıldı ve 100 ml distile suda çözündürüldü.
2. Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik asit-fosfomolibdik asit + bakır sülfat (CuSO₄)): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

Deneyin yapılışı

Gallik asit 1 mg/1 ml hesabından ve %80'lik etanol ekstresi ise 10 mg/1 ml hesabından bir konsantrasyon değeri belirlenerek hazırlanan stok çözeltiler alt konsantrasyon değerlerine sulandırıldı.

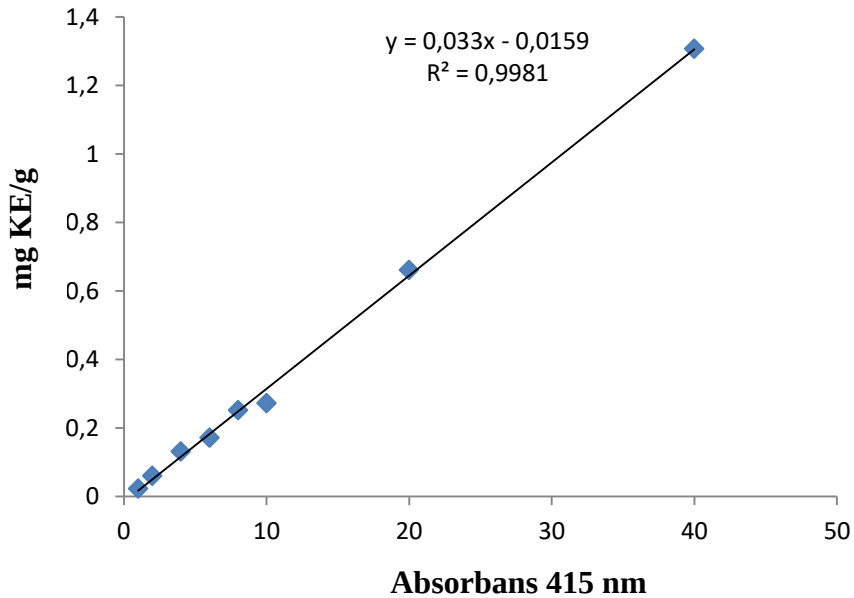
Tablo 3.1. Toplam fenolik içerik yöntemi

	Kör	Gallik Asit(200µl)	Numune(200µl)
Distile Su	200µl	---	---
FCR	1 ml	1 ml	1 ml
3 dk oda sıcaklığında beklendi.			
%2'lik NaOH	1 ml	1 ml	1 ml
2 saat oda sıcaklığında beklendi.			

Küvete konulan çözeltiler 760 nm'de tek okuma şeklinde yapıldı.

3.6.4. Toplam flavonoit içerik tayini

Toplam flavonoit içeriği, alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) kullanılarak kersetin standart eğrisine göre mg/g olarak belirlendi (Moreno ve ark., 2000).



Şekil 3.2. Toplam flavonoit tayini için kersetin standart eğrisi

Çözeltiler

1. 1 M potasyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) Çözeltisi: 9,814 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ tartıldı ve 100 ml distile suda çözündürüldü.
2. % 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ Çözeltisi: 10 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ tartıldı ve 100 ml distile suda çözündürüldü.

Deneyin yapılışı

Kersetin 1 mg/1 ml hesabından ve %80'lik etanol ekstresi ise 10 mg/1 ml hesabından bir konsantrasyon değeri belirlenerek hazırlanan stok çözeltiler alt konsantrasyon değerlerine sulandırıldı.

Tablo 3.2. Toplam flavonoit içerik yöntemi

	Kör	Kersetin(200µl)	Numune(200µl)
Distile Su	200µl	---	---
1 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$	1 ml	1 ml	1 ml
1 dk oda sıcaklığında beklendi.			
% 10'luk $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	1 ml	1 ml	1 ml
40 dk oda sıcaklığında beklendi.			

Küvete konulan çözeltiler 415 nm'de tek okuma şeklinde yapıldı.

3.7. *In vivo* Analizler

3.7.1. Toksisite testi ve dozların belirlenmesi

Toksisite testi için kullanılan 42 adet *Wistar albino* ırkı dişi sıçanlar, Kontrol, *M. neglectum* toprak üstü 100 mg/kg, *M. neglectum* toprak üstü 500 mg/kg, *M. neglectum* toprak üstü 1000 mg/kg, *M. neglectum* soğan 100 mg/kg, *M. neglectum* soğan 500 mg/kg ve *M. neglectum* soğan 1000 mg/kg şeklinde 7 gruba ayrıldı. 24 saatte bir gavaj uygulaması ile her bir sıçana 1 ml su ile çözünmüş ekstre verildi. Olası toksik etkiler bir hafta boyunca gözlemlendi. Test sonucunda herhangi bir ölüm veya toksik bulguya rastlanmadı. Buna göre ana çalışmada kullanacağımız dozu toprak üstü ve soğan için 400 mg/kg olarak belirledik.

3.7.2. Deneysel muamele ve grupların oluşturulması

Deneysel çalışmada kullanılan 42 adet Wistar albino ırkı dişi sıçanlar her grupta 6 tane olacak şekilde toplam 7 grup oluşturuldu.

(I) Kontrol grubu: Normal yem + saf su verilen grup,

(II) MTÜ grubu: grubu: Normal yem + 400 mg/kg *M. neglectum* toprak üstü ekstresi ile beslenen grup

(III) MS grubu: Normal yem + 400 mg/kg *M. neglectum* soğan grubu ekstresi ile beslenen grup.

(IV) CCl₄ grubu: Normal yem + CCl₄ (0.5 ml zeytin yağı + 0.5 ml CCl₄ dilüsyonu 1 ml/kg, intraperitoneal) verilen grup.

(V) CCl₄ +MTÜ grubu: Normal yem + 400 mg/kg *M. neglectum* toprak üstü ekstresi ile tedavi edilen CCl₄ uygulanan sıçan grubu.

(VI) CCl₄ + MS grubu: Normal yem + 400 mg/kg *M. neglectum* soğan ekstresi ile tedavi edilen CCl₄ uygulanan sıçan grubu.

(VII) CCl₄ + SLY grubu: Normal yem + 10 mg /kg silymarin ile tedavi edilen CCl₄ uygulanan sıçan grubu.

Otuz beş gün sürdürülen deneyde sıçanların *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Deney boyunca sıçanların haftalık canlı ağırlıkları hesaplandı.

3.7.3. Kan ve doku örneklerinin alınması

Otuz beş günlük deney sonunda sıçanlar % 10'luk ketamin ile anesteziye tabi tutularak enjektörler yardımıyla kalplerinden kan alındı. Kanlar biyokimya tüplerine alındı. Biyokimya tüplerindeki kan serumda bakılması gereken parametreler için kullanıldı. Karaciğer, böbrek ve mide dokuları serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile yıkandıktan sonra sıvı azot içine alınan dokular -80 °C'de derin dondurucuda saklanmaları sağlandı.

3.7.4. Doku homojenizasyonu

Derin dondurucuda (-80 °C) bekletilen karaciğer, böbrek ve mide dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak buz üzerinde çözünmeleri sağlandı.

Ekstraksiyon için 1 mmol/L EDTA ve 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.4) içeren tampon kullanıldı (Doğan ve ark., 2018). 500 mg doku üzerine 5 mL soğuk tampon eklendi. Dokular cam bagetle iyice ezilerek Ultrasonic Processor homojenizatörde (SONOPULS HD 2200, Bandelin, Berlin, Germany) 3 dakika homojenize edildi. Ekstre hemen +4 °C’de 30 dakika 9500 rpm’de santrifüj edildi. Karaciğer, böbrek ve mide dokularından elde edilen berrak süpernatantlar hedeflenen enzim tayinleri için kullanıldı.

3.7.5. Serum biyokimyasal parametreler

Serumda, Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH), Glukoz (Glu), Üre, Kreatinin, Trigliserit, Kolesterol ve Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL_C) (ARCHITECT 16200, Abbott park, IL 60064 USA) otoanalizatör cihazında Abbott biyokimya kitlerinde fotometrik olarak bakıldı.

3.7.6. Total protein tayini

Total protein konsantrasyonu için sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılarak çalışıldı (Bradford, 1976). Protein konsantrasyonu, proteine bağlanan Coomasie Blue G boya reaktifinin, 595 nm dalga boyundaki maksimum absorpsiyonunun, spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır.

Çözeltiler

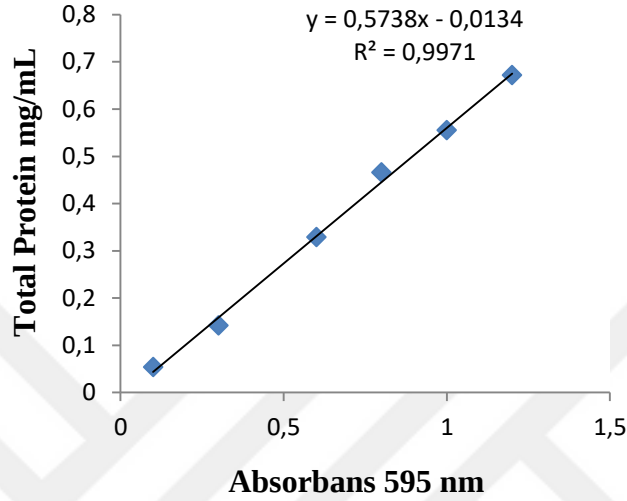
1. Konsantre Bradford solüsyonu (5×): 100 mg Coomasie Blue G, 50 mL absolü etanol ve 100 mL orto-fosforik asit (%85) içerisinde çözündürüldü. Solüsyon distile su ile 200 mL’ye tamamlandı ve filtre edildi.

2. Bradford solüsyonu (1×): Yukarıda hazırlanan solüsyonun, distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlandı.

Protein Tayin Yöntemi

Standartlar hazırlanmadan önce 10 mg/mL stok BSA hazırlandı. Stoktan seri sulandırmalar yapılarak 6 adet standart oluşturuldu. Örnek, kör ve standartlar Bradford solüsyonu ile muamele edildikten sonra, 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra, örnek ve standartların absorbansı 595

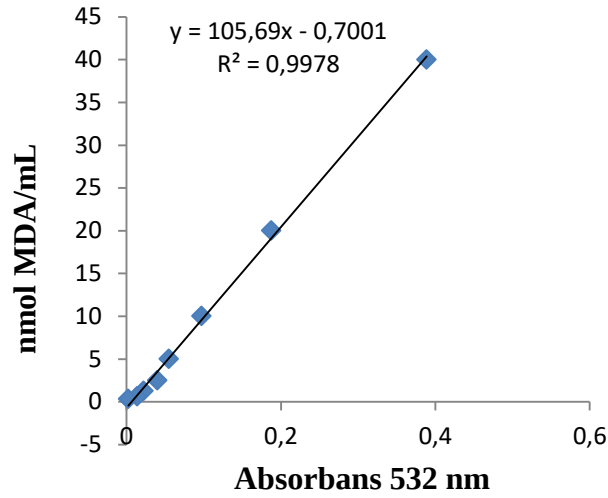
nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlara karşılık gelen absorbans değerlerine dayalı olarak standart eğri grafiği oluşturuldu. Örneklerdeki total protein konsantrasyonu eğriye ait fonksiyon kullanılarak belirlenerek sonuçlar mg/mL protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. Protein standart eğrisi

3.7.7. Malondialdehit (MDA) tayini

Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden malondialdehit, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli forma girmesi prensibine dayanır (Buege ve Aust., 1978).



Şekil 3.4. MDA standart eğrisi

Deneyin yapılışı

Deney prosedürü tabloda belirtildiği gibi uygulanarak yapıldı.

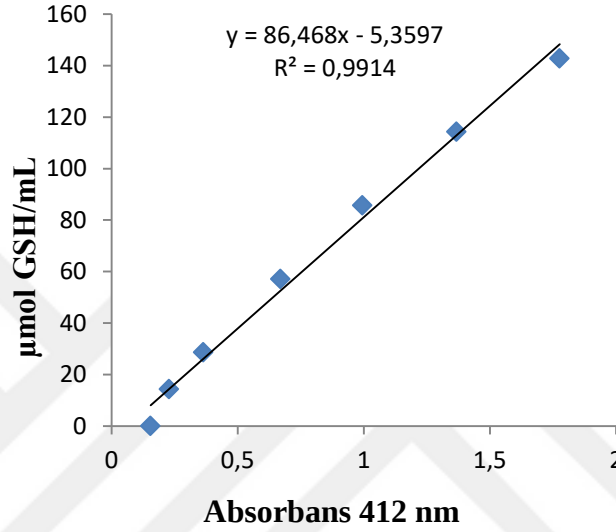
Tablo 3.3. MDA yöntemi

Ayıracılar	Numune (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
Numune	0.1	---	---
Kör	---	---	0.1
Standart	---	0.1	---
Tris-HCl tamponu (150 mM)	0.1	0.1	0.1
Askorbik asit çözeltisi (1.5 mM)	0.1	0.1	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O (1 mM)	0.1	0.1	0.1
Distile Su	0.6	0.6	0.6
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler karıştırıldı. Pipetlemeden sonra tüpler 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.			
TCA (%10)	1	1	1
TBA Çözeltisi (%0,375)	2	2	2
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra tüpler vortekslendi. Tüpler vortekslendikten sonra kaynayan su banyosunda (95 °C) 15 dakika bekletildi.			

İşlem sonrası tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 532 nm dalga boyunda tek okuma yapıldı. Sonuçlar standart grafikten (Şekil 3.4) değerlendirildi.

3.7.8. Redükte glutatyon (GSH) tayini

İndirgenmiş glutatyonun (GSH), fosfat tamponu kullanılarak süpernatanttaki sülfidril gruplarının, 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm esasına dayanmaktadır (Beutler ve ark., 1963).



Şekil 3.5. GSH standart eğrisi

Çözeltiler

1. Fosfat Çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat, distile su ile hazırlandı (pH:6.8).
2. DTNB (Ellman's Ayracı): 40 mg DTNB, %1 sodyum sitrat, 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
3. Standart çözeltileri: Standartlar için 100 μM GSH stok çözeltisi fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı daha sonra stok çözeltisi seyreltilerek 6 adet standart hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Tablo 3.4. GSH yöntemi

Ayıraçlar	Numune (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
Numune	0.2	---	---
Standart	---	0.2	---
Distile su	---	---	0.2
Fosfat Çözeltilisi	1	1	1
Tüplere şekildeki gibi pipetleme yapıldıktan sonra vortekslendi. Sonra sıcak subanyosunda 60 oC’de 10 dakika inkübe edildi ve çıkarılarak oda ısısına getirildi.			
DTNB (Ellman’s Ayıracı)	0.2	0.2	0.2
Spektrofotometrede 412 nm’de köre karşı optik dansiteleri okundu.			

GSH standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki GSH konsantrasyonu hesaplanarak sonuçlar $\mu\text{mol GSH /mg}$ protein olarak ifade edildi.

3.7.9. Glutasyon S-transferaz (GST) enzim tayini

Glutasyon S-transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun –SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm’de 37 oC’de CDNB ile glutasyon konjugasyon şiddetini ölçerek tespit edilir (Mannervik ve Guthenberg, 1981).



Deneyin yapılışı

Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen doku süpernatantları kullanıldı. Karışımlar Tablo 6’ya göre 3.5 mL’lik küvete pipetlenerek 340 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

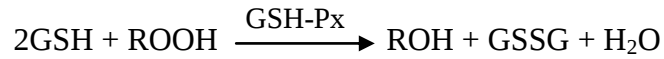
Tablo 3.5. Karışımların küvete alınması ile GST ölçümün yapılması

	Kör (mL)	Numune (mL)	Son Konsantrasyon
PBS	2.7	2.7	0.1 M
Distile Su	0.1	---	---
CDNB	0.1	0.1	1 mM
GSH	0.1	0.1	1 mM
Süpernatant	---	0.1	---

Absorbanslar, 3 dakika boyunca 30 saniyede bir kaydedilerek her örneğin absorbansındaki dk başına değişim (ΔA) belirlendikten sonra GST'nin molar ekstinksiyon katsayısı (9.6 mmol/L/cm) ve küvetteki sulandırma oranı hesaba katılarak, enzimin mL'deki aktivitesi belirlendi. Bulunan değer, örneğin mL'sindeki total protein miktarına bölünerek GST'nin spesifik aktivite değeri hesaplanarak sonuçlar, nmol CDNB-glutasyon konjugatı/dk/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.10. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim tayini

Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksitin GSH varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutasyonun formu GSSG, GR ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP⁺ 'ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir (Paglia ve Valentine, 1967).



Deneyin yapılışı

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, Ransel kit (Randox Lab., İngiltere) ile spektrofotometrede 340 nm'de ultraviyole metotla 37 °C'de ölçüldü. Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi doku süpernatantları kullanıldı. Küvet içine pipetlemeler Tablo 4.7'ye göre yapıldı.

Tablo 3.6. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Ayıracılar	Konsantrasyonları
1.Ayıracı (R1a)	
Glutasyon	4.0 mmol/L
G. Redüktaz	≥ 0.5 U/L
NADPH	0.34 mmol/L
2.Tampon (R1b)	
Fosfat	0.05 mol/L pH 7.2
EDTA	4.3 mmol/L
3.Kümen Hidroperoksit (R2)	0.18 mmol/L
4.Sulandırma Ayracı (R3)	

Tablo 3.7. GPx ayraçların küvete pipetlenmesi

Ayıracılar	Sulandırılmış Örnek	Ayıracı Köru
Örnek veya dH ₂ O	10 µL	10 µL
Ayıracı (R1)	500 µL	500 µL
Kümen (R2)	20 µL	20 µL

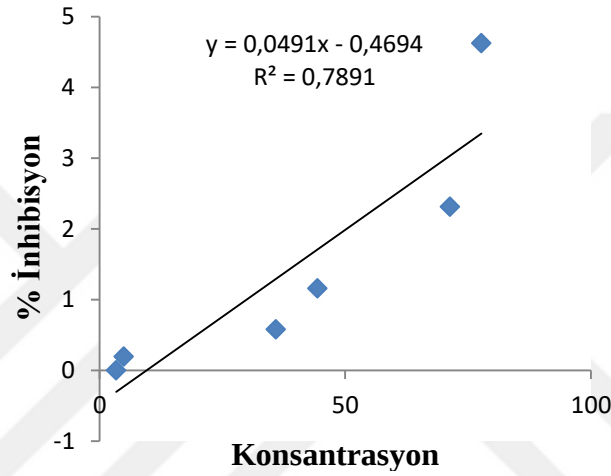
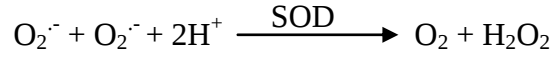
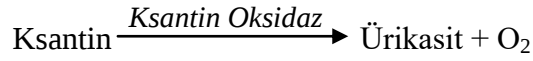
Küvete konulan solüsyonlar iyice çalkalandıktan sonra, örneğin ve körun başlangıç absorbansı, 340 nm dalga boyunda 37 °C’de 2 dk boyunca spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Hesaplama

GPx konsantrasyonu, kitte önerilen formülden ($U/L = 8412 \times \Delta A_{340}/dk$) yararlanılarak hesaplandı. Bulunan değer, U/mL’ye dönüştürüldükten sonra, örneğin mL’indeki total protein miktarına bölünerek GPx’in spesifik aktivite değeri belirlenerek sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.11. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim tayini

SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandıran antioksidan bir enzimdir. SOD ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksit radikali, 2-(-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klörür (INT) ile kırmızı boya formuna dönüşmesi reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmesi prensibine dayanır (McCord ve Fridovich, 1969).



Şekil 3.6. SOD standart eğrisi

Deneyin yapılışı

SOD enzim aktivitesi Randox-Ransod enzim kiti ile AE-S90-MD UV/VIS spektrofotometrede 505 nm’de 37 °C’de ölçüldü (Randox Lab., İngiltere).

Tablo 3.8. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Ayırıcılar	Konsantrasyonları
1.Karışık Substrat	
Ksantin	0.05 mmol/L
I.N.T.	0.025 mmol/L
2.Tampon	
CAPS	40 mmol/L pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/L
3.Ksantin Oksidaz (XO)	80 U/L
4.Standart	5.70/mL

Kör (S1) olarak, 0.01 mol fosfat tamponu (pH: 7.0) kullanıldı. Kalibrasyon stok solüsyonu 10 mL distile su içerisinde hazırlandı (4.6 U/mL). Standartlar (S2–S6), kitte belirtildiği şekilde, 0.01 mol fosfat tamponu ile kalibrasyon stok solüsyonundan seyreltilerek oluşturuldu. Ölçüm yapılırken, süpernatantın 25 µL’si küvet içerisine pipetlendikten sonra üzerine 850 µL substrat karışımı eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, bu karışımın üzerine 125 µL ksantin oksidaz ilave edildi (Tablo 3). Küvetteki karışımın başlangıç absobansı (A1) 505 nm’de 37 °C’de 30 s sonra ölçülerek ve kaydedildi. Ölçüme 3 dk boyunca devam edildi ve son absorbans değeri (A2), 3. dk’nın sonunda kaydedildi. Kör ve standartların absorbans değerlerinin ölçümleri de yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.9. Küvete SOD ayraçların pipetlenmesi

Küvet içi	S1 (µL)	S2-S6 (µL)	Örnek (µL)
Örnek	25	---	---
Standart	---	25	---
Örnek Sulandırıcı	---	---	25
Substrat Karışımı (R1)	850	850	850
Ksantin Oksidaz (R2)	125	125	125

Hesaplama

Standart ve örneklere ait dakika başına düşen absorbans değeri ($\Delta A = (A_2 - A_1)/3$) hesaplandıktan sonra bütün standartlar ve örnekler için % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllerden yararlanılarak hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{StdDk}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{BlankDk}})} = \% \text{ İnhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{\text{ÖrnekDk}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{BlankDk}})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

Standartların U/mL cinsinden bilinen konsantrasyonlarına karşılık gelen % inhibisyon değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu. Örneklerdeki SOD aktivitesi, bu eğriden elde edilen denkleme göre U/mL olarak belirlendi. Bulunan değer, örneğin mL’indeki total protein miktarına bölünerek SOD’un spesifik aktivite değeri hesaplanarak sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

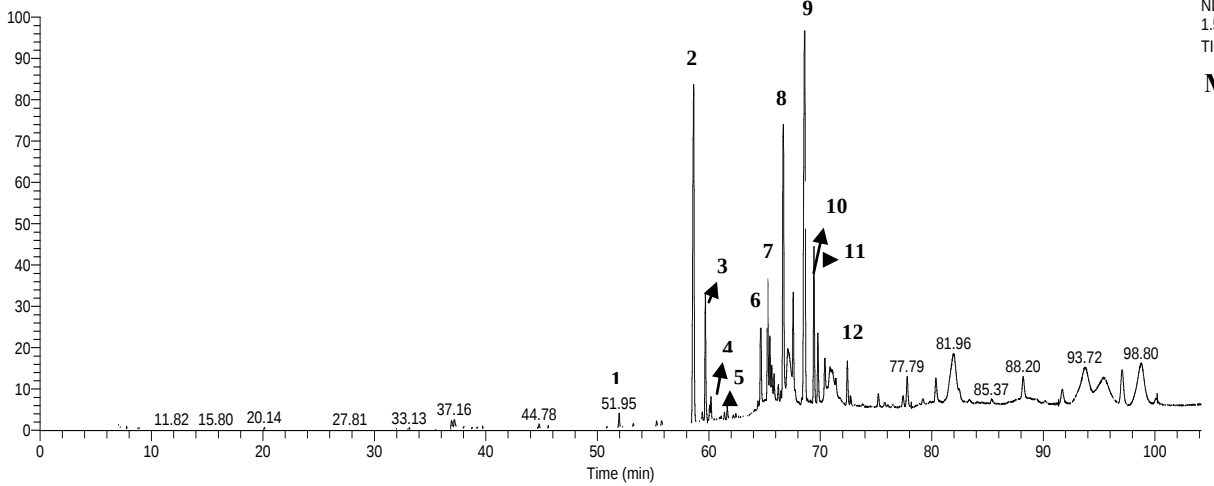
4. BULGULAR

M. neglectum bitkisinin toprak üstü (MTÜ) kısımlarına ait %80'lik etanol ekstresinin fitokimyasal içeriklerinin GC-MS ve kromatogram analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de sunulmuştur. MTÜ ekstresinde sırasıyla 8,11 oktadekadienoik asit (% 25.66), 9,12,15 oktadekatrienoik asit (% 21.50) ve hekzadekanoik asit (% 16.64) metil esterlerin ana bileşenler olduğu belirlendi.

Tablo 4.1. *M. neglectum* toprak üstü etanolik ekstre GC-MS sonuçları

No	RT (min)	Bileşik ismi	Alan %
1	51.95	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)	0.47
2	58.64	Hexadecanoic acid, methyl ester	16.64
3	59.69	Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	4.63
4	60.19	7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	1.21
5	61.65	Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester (CAS)	0.38
6	64.66	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	4.94
7	65.28	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	6.85
8	66.68	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS)	25.66
9	68.60	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester (CAS)	21.50
10	69.43	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	4.87
11	70.40	Eicosanoic acid, methyl ester (CAS)	11.18
12	72.42	Dodecyltetraglycol	1.66

RT: 0.00 - 104.17



NL:
1.52E9
TIC MS
MTÜ

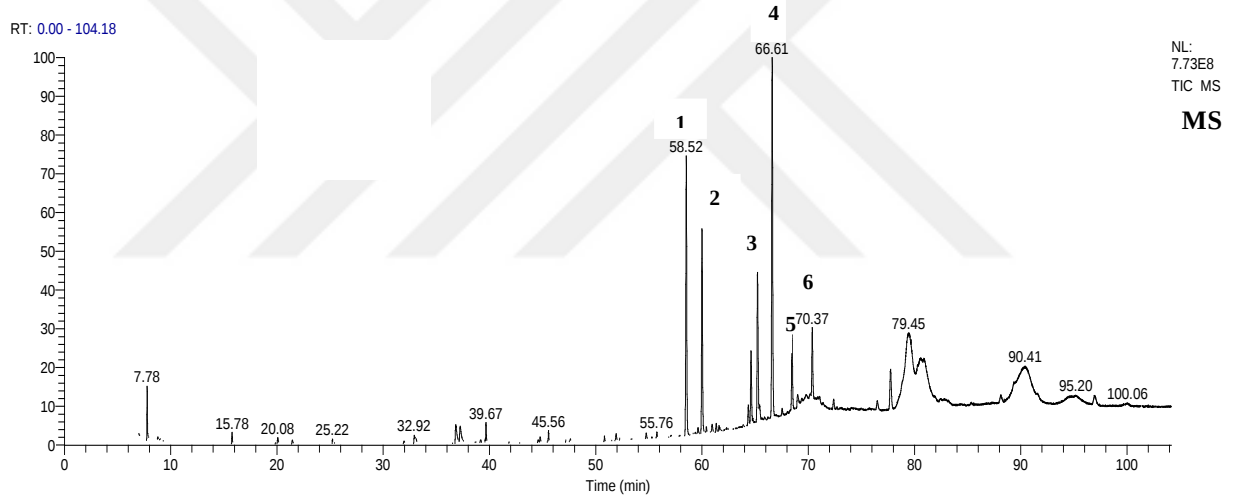
Şekil 4.1. *M. neglectum* toprak üstü etanolik ekstre GC-MS kromatogramı

1: Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS), 2: Hexadecanoic acid, methyl ester, 3: Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS), 4: 7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-, 5: Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester (CAS), 6: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS), 7: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS), 8: 8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS), 9: 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester (CAS), 10: 9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-, 11: Eicosanoic acid, methyl ester (CAS), 12: Dodecyltetraglycol

M. neglectum bitki türünün soğan (MS) kısımlarına ait %80'lik etanol ekstresinin fitokimyasal içeriklerinin GC-MS ve kromatogram analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. MS ekstresinde sırasıyla 9,12 oktadekadienoik asit (Z,Z) (% 28.77), oktadekanoik asit (% 21.73) ve hekzadekanoik asit (% 20.80) metil esterlerin ana bileşenler olduğu belirlendi.

Tablo 4.2. *M. neglectum* soğan etanolik ekstre GC-MS sonuçları

No	RT (min)	Bileşik ismi	Alan %
1	58.52	Hexadecanoic acid, methyl ester	20.80
2	60.00	1,4-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester	15.39
3	64.62	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	21.73
4	66.61	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z), methyl ester	28.77
5	68.47	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	5.20
6	70.37	Eicosanoic acid, methyl ester (CAS)	8.11



Şekil 4.2. *M. neglectum* soğan etanolik ekstre GC-MS kromatogramı

1: Hexadecanoic acid, methyl ester, 2: 1,4-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester, 3: Octadecanoic acid, methyl ester (CAS), 4: 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z), methyl ester, 5: 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-, 6: Eicosanoic acid, methyl ester (CAS)

Tablo 4.3. *M.neglectum* bitki kısımlarına ait toplam fenolik ve flavonoit içerikleri

Materyal	Ekstre	Toplam fenolik içerik (mg GAE/g) ¹	Toplam flavonoit içerik (mg KE/g) ²
MTÜ	Etanol	17.4 ± 0.42 ^a	16.6 ± 0.23 ^a
MS	Etanol	5.7 ± 0.17 ^b	1.0 ± 0.01 ^b

Tablodaki her bir değer ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur (n=3).

Aynı sütunda farklı harfler (a,b) istatistiksel önem farkı gösterir (P< 0.05).

1: Gallik asit (GAE) eşdeğeri olarak ifade edilen toplam fenolik içerik

2: Kersetin (KE) eşdeğeri olarak ifade edilen toplam flavonoit içerik

MTÜ: *M. neglectum* toprak üstü, MS: *M. neglectum* soğan

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi MTÜ etanolik ekstredeki toplam fenolik ve flavonoit içeriği sırasıyla 17.4±0.42 ve 16.6±0.23 olarak bulunurken, MS'de ise 5.7±0.17 ve 1.0±0.01 olarak bulundu. Elde edilen verilere göre, MTÜ ekstresindeki toplam fenolik ve flavonoit içerikleri MS'ye göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P< 0.05).

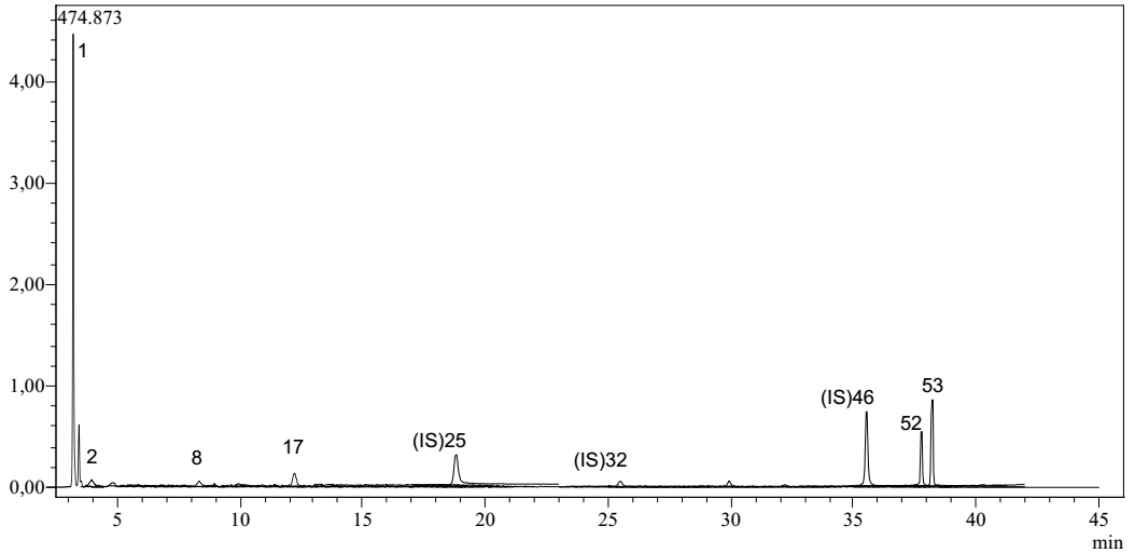
Çalışmamızda LC-MS/MS analizleri, daha önce bitki türlerinde 53 fitokimyasal bileşiğin (çoğunlukla fenolik asitler ve flavonoitler) yöntem validasyonu yapılmış sonuçlara göre yapıldı (Ek 3 ve Ek 4). Elde ettiğimiz LC-MS/MS sonuçlarına göre; *M. neglectum*'un toprak üstü (MTÜ) etanol ekstrelerinde kinik asit, fumarik asit, gentisik asit, kafeik asit, kemferol ve apigenin (sırasıyla, 1.726, 5.771, 0.138, 0.052, 0.035 ve 0.092 ug/g), soğan (MS) etanol ekstresinde kinik asit, fumarik asit, kafeik asit ve kemferol (sırasıyla 0.411, 1.567, 0.619 ve 0.300 ug/g) kayda değer miktarda bulunmuştur (Tablo 4.4; Şekil 4.3 ve 4.4). MTÜ kısmında fumarik ve kinik asitler, MS kısmında ise fumarik ve kafeik asitlerin majör bileşikler olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. *M. neglectum* türünün MTÜ ve MS etanol ekstrelerindeki fitokimyasalların LC–MS/MS (mg analit/g ekstre) ile kantitatif taraması

No ^a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
MTÜ ^b	1.726	5.771	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.138	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.052	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
MS ^c	0.411	1.567	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.619	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
No ^a	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
MTÜ ^b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.035	0.092	N.D	N.D	N.D
MS ^c	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.300	N.D	N.D	N.D	N.D

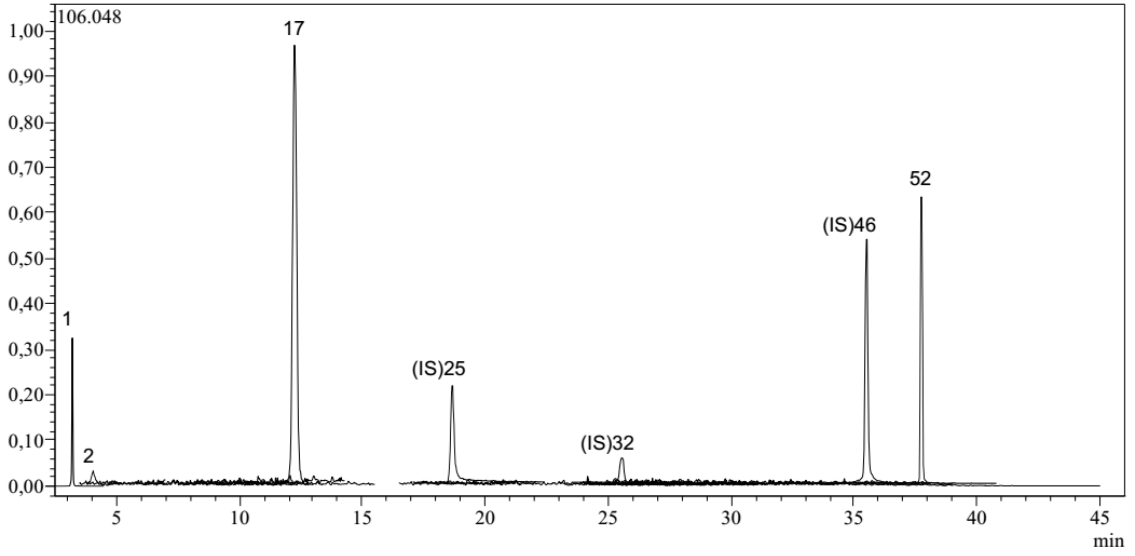
No^a:Bakılan 53 adet standart fitokimyasal bileşikler gösterir. (1: Kinik asit. 2: Fumarik asit. 3: Akonitik asit. 4: Gallik asit. 5: Epigallokateşin. 6: Protokateşik asit. 7: Kateşin. 8: Gentisik asit. 9: Klorojenik asit. 10: Protokateşik aldehit. 11: Tanik asit. 12: Epigallokateşin galat. 13: 1,5-dikaffeoilkinik asit. 14: 4-OH Benzoik asit. 15: Epikateşin. 16: Vanilik asit. 17: Kafeik asit. 18: Siringik asit. 19: Vanilin. 20: Siringik aldehit. 21: Daidzin. 22: Epikateşin galat. 23: Piceid. 24: p-Kumarik asit. 26: Ferulik asit. 27: Sinapik asit. 28: Kumarin. 29: Salisilik asit. 30: Sinarosid. 31: Miquelianin. 32: Rutin. 34: İzokersitrin. 35: Hesperidin. 36: o-Kumarik asit. 37: Genistin. 38: Rosmarinik asit. 39: Ellagik asit. 40: Kozmosiin. 41: Kuersitrin. 42: Astragalin. 43: Nikotiflorin. 44: Fisetin. 45: Daidzein. 47: Quercetin. 48: Naringenin. 49: Hesperetin .50: Luteolin .51: Genistein. 52: Kaempferol. 53: Apigenin. 54: Amentoflavon. 55: Chrysin. 56: Acacetin.

N.D: Belirlenmedi. MTÜ^b: *M. neglectum* toprak üstü. MS: *M. neglectum* soğan.



Şekil 4.3. *M. neglectum* MTÜ etanol ekstresinin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) LC–MS/MS kromatogramı

1:Kinik asit. 2:Fumarik asit. 8:Gentisik asit. 17:Kafeik asit. 52:Kemferol. 53:Apigenin.



Şekil 4.4. *M. neglectum* MS etanol ekstresinin TIC (Toplam İyon Kromatogramı) LC–MS/MS kromatogramı

1:Kinik asit. 2:Fumarik asit. 17:Kafeik asit. 52:Kemferol.

Çalışmamızın *in vivo* ayağında, toksisite testi sonrası 42 adet *Wistar albino* türü dişi sıçan kullanıldı. 42 adet sıçan her grupta 6 tane olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Gruplar: Kontrol, *M. neglectum* (MTÜ) toprak üstü (400 mg/kg) ekstresi, *M. neglectum* (MS) soğan (400 mg/kg) ekstresi, karbonditetraklorür (CCl₄), CCl₄ + MTÜ (400 mg/kg), CCl₄ + MS (400 mg/kg) ve CCl₄ + SLY (10 mg/kg) şeklinde oluşturuldu. Beş hafta

sürdürülen çalışmada yukarıdaki uygulamalara ek olarak deney boyunca hayvanlar su ve yem bakımından *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı.

İlk ve son canlı hayvan ağırlıkları (CHA) Tablo 4.5’de gösterilmiştir. Her grubun kendi içinde ilk ve son CHA kıyaslanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P<0.05$).

Tablo 4.5. Deneysel gruplara ait ilk ve son hafta canlı hayvan ağırlıkları

Gruplar	Canlı Hayvan Ağırlıkları (CHA)	
	İlk CHA (g)	Son CHA (g)
Kontrol	199±23.11	211.83±23.94
MTÜ	230.50±24.04	232.50±40.05
MS	199.67±10.33	205.00±8.75
CCl ₄	205.17±4.75	203.67±6.77
CCl ₄ +MTÜ	213.33±10.63	222.60±28.58
CCl ₄ +MS	197.67±10.19	212.00±11.18
CCl ₄ +SLY	215.67±22.53	204.50±18.83

Deneysel gruplara ait ilk ve son CHA verileri ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur (n=6).

MTÜ: *M. neglectum* toprak üstü, MS: *M. neglectum* soğan

Çalışmada bakılan biyokimyasal parametreler Tablo 4.6’de verilmiştir. CCl₄ grubu AST düzeyi MTÜ grubu dışındaki diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ($P<0.05$). Diğer yandan MTÜ grubu AST değeri Kontrol, CCl₄+MTÜ, CCl₄+MS, CCl₄+SLY gruplarına göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).

CCl₄ grubu ALT düzeyi Kontrol grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).

CCl₄+MTÜ grubu kreatinin değeri Kontrol, MTÜ ve CCl₄ gruplarına göre düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).

Diğer parametrelerde ise grupların birleriyle karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmadı ($P<0.05$).

Tablo 4.6. Deneysel gruplara ait biyokimyasal parametre düzeyleri

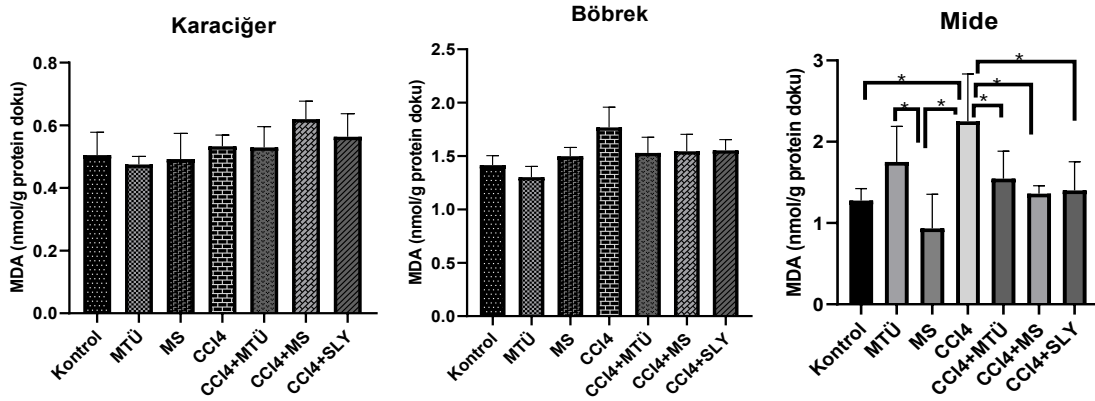
Parametreler	Gruplar						
	Kontrol	MTÜ	MS	CCl ₄	CCl ₄ +MTÜ	CCl ₄ +MS	CCl ₄ +SLY
AST (U/L)	79.17±5.08 ^{cd}	113.50±17.31 ^{ab}	92.00±11.42 ^{bcd}	113.83±14.00 ^a	78.20±6.50 ^d	72.40±9.71 ^d	81.33±14.44 ^{cd}
ALT (U/L)	35.17±7.83 ^b	48.00±6.72 ^{ab}	38.20±9.96 ^{ab}	49.67±5.71 ^a	38.40±4.15 ^{ab}	43.60±11.89 ^{ab}	41.00±6.96 ^{ab}
LDH (U/L)	403.17±229.13 ^a	358.83±122.36 ^a	402.40±136.30 ^a	552.17±216.24 ^a	494.60±78.19 ^a	448.00±150.35 ^a	548.67±164.67 ^a
Glukoz (mg/dL)	120.67±20.40 ^a	112.50±27.37 ^a	126.80±34.64 ^a	137.17±14.45 ^a	111.80±14.06 ^a	134.40±11.78 ^a	127.33±45.50 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0.58±0.04 ^a	0.58±0.04 ^a	0.58±0.03 ^{ab}	0.59±0.05 ^a	0.50±0.02 ^b	0.55±0.04 ^{ab}	0.52±0.05 ^{ab}
Üre (mg/dL)	48.50±6.50 ^b	66.17±10.11 ^{ab}	60.40±22.62 ^{ab}	55.67±9.63 ^{ab}	58.80±1.64 ^{ab}	60.20±9.88 ^{ab}	69.33±7.71 ^a
Kolesterol (mg/dL)	60.17±6.76 ^a	50.83±11.79 ^a	50.80±11.60 ^a	53.17±11.94 ^a	47.20±3.77 ^a	57.60±14.12 ^a	44.67±6.41 ^a
Trigliserit (mg/dL)	27.50±7.01 ^a	23.33±6.05 ^a	34.40±10.11 ^a	28.50±7.23 ^a	29.00±4.41 ^a	20.00±2.91 ^a	27.17±10.34 ^a
HDL _c (mg/dL)	46.30±4.96 ^a	39.00±7.88 ^a	43.12±7.67 ^a	38.15±6.44 ^a	36.04±4.27 ^a	44.96±11.56 ^a	34.57±4.10 ^a

Tablodaki her bir değer ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur (n=6).

Aynı sütunda farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel önem farkı gösterir (P< 0.05).

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, LDH: Laktat dehidrogenaz, HDL_c: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol

MTÜ: *M. neglectum* toprak üstü, MS: *M. neglectum* soğan



Şekil 4.5. Karaciğer, böbrek ve mide dokularına ait MDA içerikleri
*:p<0.05

Karaciğer, böbrek ve mide dokusuna ait MDA içerikleri Şekil 4.5'teki gibidir.

Hem karaciğer hem de böbrek dokularına ait MDA içeriklerinin grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark bulunmadı.

Mide dokusuna ait MDA içeriklerinde, CCl₄ grubu MDA düzeyi MTÜ grubu dışındaki diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (P<0.05). Ayrıca, mide dokusu MTÜ grubu MDA düzeyi MS grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05).

Karaciğer, böbrek ve mide dokusuna ait GSH düzeyi ile GST, GPx ve SOD enzim aktiviteleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

CCl₄ grubunda karaciğer GSH düzeyi Kontrol ve CCl₄+MS gruplarına göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05). Ayrıca karaciğer GSH düzeyi Kontrol grubu MTÜ grubuna göre; CCl₄+MS ve CCl₄+SLY grupları ise CCl₄+MTÜ grubuna göre artışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05). Karaciğer GST enzim aktivitesi CCl₄ ve CCl₄+SLY gruplarında Kontrol ve MTÜ gruplarına göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05).

Böbrek dokusu CCl₄ grubu GSH düzeyi Kontrol grubuna göre düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05). Ayrıca, böbrek dokusu MTÜ grubu GST aktivitesi tüm gruplara göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05).

Mide dokusu GSH düzeyi CCl_4 grubunda diğer tüm gruplara göre azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Benzer şekilde CCl_4 grubu GST aktivitesi CCl_4+SLY grubuna göre düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Diğer yandan, CCl_4 uygulanan tüm grupların SOD enzim aktiviteleri Kontrol grubuna göre azalmaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).



Tablo 4.7. Deneysel gruplara ait karaciğer, böbrek ve mide dokularındaki GSH düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri

Doku	Parametre	Gruplar						
		Kontrol	MTÜ	MS	CCl ₄	CCl ₄ +MTÜ	CCl ₄ +MS	CCl ₄ +SLY
Karaciğer	GSH (μmol/g Prt)	6.10±0.68 ^a	4.30±0.84 ^{bcd}	4.91±1.26 ^{abc}	3.34±0.41 ^{cd}	2.80±0.76 ^d	5.63±1.24 ^{ab}	4.79±0.95 ^{abc}
	GST (nmol/g prt)	99.97±18.22 ^{ab}	101.60±13.56 ^a	76.81±12.58 ^{abc}	63.18±18.63 ^c	71.74±12.42 ^{bc}	74.47±11.29 ^{abc}	70.67±18.95 ^c
	GPx (U/g prt)	210.11±50.80 ^a	177.76±13.17 ^a	201.24±48.84 ^a	159.38±38.39 ^a	218.65±32.98 ^a	226.97±72.35 ^a	205.40±47.15 ^a
	SOD (U/g prt)	110.60±19.17 ^a	89.13±7.77 ^a	91.29±21.71 ^a	93.09±11.86 ^a	97.38±9.14 ^a	115.80±23.65 ^a	98.32±19.37 ^a
Böbrek	GSH (μmol/g Prt)	3.30±0.86 ^{ab}	3.75±1.30 ^a	3.57±0.69 ^{ab}	2.24±0.48 ^b	2.68±0.27 ^{ab}	2.60±0.66 ^{ab}	2.90±0.47 ^{ab}
	GST (nmol/g prt)	2.66±0.83 ^b	5.14±0.98 ^a	3.50±0.86 ^b	2.83±0.55 ^b	2.00±0.51 ^b	2.50±0.79 ^b	3.45±1.19 ^b
	GPx (U/g prt)	210.32±28.54 ^a	201.95±50.60 ^a	204.72±32.82 ^a	186.84±14.80 ^a	186.68±13.91 ^a	194.25±38.69 ^a	216.98±34.96 ^a
	SOD (U/g prt)	108.63±13.20 ^a	115.02±39.31 ^a	100.55±11.19 ^a	88.40±12.26 ^a	82.67±10.77 ^a	91.30±7.99 ^a	97.35±18.55 ^a
Mide	GSH (μmol/g Prt)	9.34±1.56 ^a	10.04±2.90 ^a	9.61±1.91 ^a	4.67±1.80 ^b	9.62±2.34 ^a	8.46±1.43 ^a	9.24±1.36 ^a
	GST (nmol/g prt)	17.34±5.33 ^{ab}	20.39±5.35 ^{ab}	19.46±6.41 ^{ab}	15.73±3.96 ^b	19.54±6.30 ^{ab}	18.44±3.61 ^{ab}	26.15±5.16 ^a
	GPx (U/g prt)	728.53±151.11 ^a	704.15±82.51 ^a	718.61±141.31 ^a	610.37±43.39 ^a	604.91±53.60 ^a	582.37±49.24 ^a	679.26±98.10 ^a
	SOD (U/g prt)	393.17±90.09 ^a	312.58±44.13 ^{ab}	347.91±50.02 ^{ab}	283.44±18.15 ^b	277.11±29.26 ^b	259.05±28.03 ^b	288.35±50.95 ^b

Tablodaki her bir değer ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur (n=6).

Aynı sütunda farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel önem farkı gösterir (P< 0.05).

GSH: Redükte glutatyon, GST: Glutatyon S-transferaz, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz, MTÜ: *M. neglectum* toprak üstü, MS: *M. neglectum* soğan.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Arap üzümü (*Muscari neglectum* Guss. Ex Ten.) bitkisine ait toprak üstü (MTÜ) ve soğan (MS) kısımlarına ait %80'lik etanol ekstresinin hem *in vitro* (GC-MS, LC-MS/MS, toplam fenolik ve toplam flavonoit) içerik analizleri hem de CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda bu ekstrenin serum biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkisine ek olarak lipid peroksidasyonu ve antioksidan rolü karaciğer, böbrek ve mide dokusu supernatantlarında *in vivo* olarak ilk kez çalışılmıştır. Ayrıca, pozitif kontrol grubu olarak başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokular üzerinde koruyucu etki mekanizması iyi bilinen sliymarin (10 mg/kg, oral) kullanıldı (Doğan ve Anuk, 2019).

Tez çalışmasının *in vitro* ayağında *M. neglectum* bitkisinin toprak üstü (MTÜ) ekstresindeki GC-MS uçucu yağ bileşiklerin tanımlanması % tepe alanı indeksine göre oktadekadienoik asit (%25.66), 9,12,15-oktadekatrienoik asit (%21.50) ve hegzadekanoik asit (%16.64) metil esterleri major yağ asitleri olarak bulunurken, bitkinin soğan (MS) kısmında ise 9,12-oktadekadienoik asit (Z,Z) (%28.77), oktadekanoik asit (% 21.73) ve hegzadekanoik asit (% 20.80) metil esterleri ana yağ asitleri olarak tespit edildi (Tablo 4.1, 4.2; Şekil 4.1, 4.2). *M. neglectum* *n*-hekzan ekstresinde 32 biyoaktif fitokimyasal bileşiğin tanımlandığı GC-MS analiz sonuçlarına göre bis(2-etilhekzil)ftalat (%18,6), tribütiletilstannan (%10,1), bis(klorofenil)sülfon (%8,7), giberellin (%4,9) ve 6,10-dodekatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil (%3.3) yağ bileşiklerinin majör ürün olduğunu belirlemişlerdir (Nasrabadi ve ark., 2013).

Oktadekadienoik asitin yapılan çalışmalarda yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu (Olaleye ve ark., 2019), 9,12,15-oktadekatrienoik asitin sağlık için gerekli olan esansiyel bir yağ asidi olduğu ve antioksidan özelliğiyle antikanserojen ve antienflamatuvar etki gösterdiği ve böbrekte koruyucu rol oynadığı (İstifli ve ark., 2019) rapor edilmiştir. Hekzadekanoik asitin karaciğer hastalıklarını tetikleyebilen bir bileşik olduğu belirlenmiştir (Jin ve ark. 2017). Bir başka çalışmada ise CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan farelerde *Rosmarinus officinalis* bitki ekstresinin hegzadekanoik asit içeriği bakımından zengin olduğu ve antioksidan etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir (El-Hadary ve ark., 2017).

LC-MS/MS ile etanol ekstrede daha önce yöntem validasyonu yapılan 53 fitokimyasala göre kantitatif miktar tayini yapıldı (Yılmaz, 2020). LC-MS/MS sonuçlarına göre *M. neglectum*'un toprak üstü (MTÜ) etanol ekstrelerinde kinik asit, fumarik asit, gentisik asit, kafeik asit, kemferol ve apigenin (sırasıyla, 1.726, 5.771, 0.138, 0.052, 0.035 ve 0.092 ug/g), soğan (MS) etanol ekstresinde kinik asit, fumarik asit, kafeik asit ve kemferol (sırasıyla 0.411, 1.567, 0.619 ve 0.300 ug/g) kayda değer miktarda bulunmuştur (Tablo 4.4). MTÜ kısmında fumarik ve kinik asitler, MS kısmında ise fumarik ve kafeik asitlerin majör bileşikler olduğu rapor edilmiştir. Sonuçlarımız daha önce yapılan yöntem validasyonu ile uyumlu olduğu görülmüştür (Yılmaz, 2020). Ayrıca, daha önce yapılmış çalışmalarda *Muscari* türlerinde benzer bileşiklerin olduğu belirlenmiştir (Giglio ve ark., 2021; Özcan ve ark., 2018).

Bitkilerdeki fitokimyasal doğal antioksidanlar serbest radikal hasarına karşı koruma sağlarlar (Altemimi ve ark., 2017). Antioksidan etki gösteren fumarik asidin ülseri önlemede mide koruyucu (Kuroda ve Akao, 1977), hepatokarsinogenez önleyici (Kuroda ve ark., 1987), sinir hasarı önleyici ve antienflamatuvar (Linker ve ark., 2011) etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Kafeik asidin antioksidan özelliğinden dolayı diyabetin oluşturduğu kalp hasarını önlemede etkisi olduğu (Okutan ve ark., 2005), mide koruyucu özelliği bulunduğu (Hirose ve ark., 1990), antienflamatuvar, antimutajenik, antibakteriyel ve antikanserojen etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Genaro-Mattos ve ark., 2015). Kinik asidin güçlü bir antioksidan ve antienflamatuvar etkisinden dolayı serbest radikal önleyici etkisi olduğu ve diyet yoluyla alınımının gastrointestinal kanalda triptofan ve nikotinamid sentezine yardımcı olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2020). Bir flavonoid olan kemferolün antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve antidiyabetik etkilere sahip olmakla birlikte gastroprotektif özelliği ile mide ülserlerinde koruyucu etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir (Li ve ark., 2018).

MTÜ etanolik ekstredeki toplam fenolik ve flavonoid içeriği Tablo 4.3'te görüldüğü gibi sırasıyla 17.4 ± 0.42 ve 16.6 ± 0.23 olarak bulunurken, MS'de ise 5.7 ± 0.17 ve 1.0 ± 0.01 olarak bulundu. Daha önce yapılmış bir çalışmada, *M. neglectum* ekstresinin toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin içerikleri sırasıyla %18.2, %0.94 ve %0.11 olduğu rapor edilmiştir (Mahboubi ve Taghizadeh, 2016).

Fenolik bileşiklerin, hidrojen verici, tekli oksijen söndürücü, indirgeyici ajan ve metal iyonların şelatlayıcı hareketleri gibi redoks özelliklerinden dolayı çok güçlü oranda antioksidan etki gösterdikleri için; flavonoidlerin ise antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuvar, antitrombotik, antikanserojenik ve antimutajenik etkilere sahip olduğu, serbest radikal süpürücü etki gösterdiği ve trigliseritlerin oksidasyonu esnasında oluşan radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırabileceğinden dolayı canlılar için önemli oldukları belirtilmiştir (Mustafa ve ark., 2010).

Tez çalışmasının *in vivo* ayağında *M. neglectum* etanol ekstresinde tespit edilen bileşiklerin olası etkileri CCl_4 toksisitesine karşı sıçan hayvan modelinde araştırıldı. Bu sebeple, mekanizmaları tanımlamak ve potansiyel tedaviyi keşfetmek için CCl_4 ile doku hasarı oluşturarak sıçan hayvan modelini kullandık. Çünkü CCl_4 'e maruz kalma, çeşitli hepatoprotektif doğal özleri araştırmak için en yaygın kullanılan modellerden biridir (Doğan ve ark., 2021). CCl_4 karaciğerde oluşturduğu akut ve kronik toksisite ile steatoz, hücresel nekroz, fibroz ve sirozla sonuçlanmasına sebep olur (Weber ve ark., 2003). Karaciğerde, CCl_4 sitokrom p450 tarafından yüksek oranda reaktif olan triklorometil serbest radikale ($\text{CCl}_3\cdot$) metabolize edilir, daha sonra triklorometil peroksi radikale ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) dönüştürülür. $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ hücre makromoleküler proteini ve sitoplazmik membran fosfolipitlerinde bulunan yağ asitleri ile reaksiyona girerek daha toksik triklorometil peroksil radikalleri ($\text{CCl}_3\text{O}\cdot$) oluşturur. Sonuç olarak, lipid membranlarının peroksidatif bozunması meydana gelir ve lipid peroksidlerin oluşumuna yol açar (Winczura ve ark., 2012).

Antioksidanlar serbest radikalleri temizleme, oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilen ve kronik hastalık riskini azaltması gibi önemli koruyucu maddelerdir (Suzek ve ark., 2016). Antioksidanlar tarafından bu zararlılar elimine edilmezse artan oksidatif strese bağlı olarak serbest radikaller hücre membranı, protein, nükleik asit ve karbonhidratlarda oksidasyona sebep olur. Bu durum, karaciğer ve böbrek gibi doku hasarı biyobelirteç enzimlerinin dolaşıma sızmasına sebep olur. Dolaşımdaki bu enzim düzeylerinin yüksekliği doku hasar boyutunun klinik yorumlanmasında önemli katkılar sunar. CCl_4 ile oksidatif stres oluşturulan pek çok sıçan çalışmasında serum AST, ALT, LDH, kreatinin, üre, kolesterol, trigliserit ve LDL gibi parametrelerde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Doğan ve ark., 2018; Suzek ve ark., 2016; Tong ve ark., 2015).

Ayrıca, CCl_4 kaynaklı oluşan doku hasarında lipit peroksidasyonun majör ürünü MDA düzeyinde artış ve antioksidan enzim aktivitelerinde ise düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (Ekpo ve ark., 2021; Suzek ve ark., 2017; He ve ark., 2012). Sonuçlarımıza göre, CCl_4 uygulaması AST ve ALT düzeyinde artışa neden olduğu ancak CCl_4 'ün *M. neglectum* ekstreleriyle birlikte uygulanması, 5 haftalık uygulamadan sonra MTÜ ve MS ekstreleri AST ve kreatinin düzeyinde düşüşe neden olduğu diğer parametrelerde belirgin bir iyileşmeyi gerçekleştirmediği görülmüştür. Ancak, mide dokusunda MTÜ ve MS ekstreleri CCl_4 'ün sebep olduğu lipit peroksidasyonu önleyerek MDA düzeyini önemli oranda düşürdüğü, GSH ile beraber antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin bir iyileşme gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımız, *M. neglectum* bitkisinin mide koruyucu etkisinin olabileceğine dair yapılmış çalışmalarla uyumludur (Eroğlu Özkan ve ark., 2018a; Demirci Kayıran ve Eroğlu Özkan, 2017).

Çalışmamızda, *M. neglectum*'un mide dokusu üzerinde anlamlı sonuçlar vererek CCl_4 'ün oluşturduğu oksidatif strese karşı, mide koruyucu etki göstermesi *M. neglectum* ekstresinde bulunan fumarik asitin (Kuroda ve Akao, 1977) ve kemferolün (Li ve ark., 2018) mide ülserine karşı koruyucu etki göstermesi, kafeik asitin mide koruyucu özellik sergilemesi (Hirose ve ark., 1990) ve kinik asitin gastrointestinal kanalda triptofan ve nikotinamid sentezinde rol alması (Liu ve ark., 2020) ile açıklanabilir. Ancak *M. neglectum*'un CCl_4 'ün oluşturduğu oksidatif strese karşı, karaciğer dokusu üzerinde anlamlı sonuçlar vermemesi, *M. neglectum* ekstresinde tespit edilen hekzadekanoik asitin karaciğer hastalıklarını tetikleyebilen bir bileşik olması (Jin ve ark., 2017) ile bağdaştırılabilir. *M. neglectum* ekstresinde tespit edilen 9,12,15-oktadekatrienoik asitin yapılan diğer çalışmalarda böbrek koruyucu etkisi (İstifli ve ark., 2019) rapor edilmiş olmasına rağmen çalışmamızda CCl_4 'ün oluşturduğu oksidatif strese karşı, böbrek dokusu üzerinde *M. neglectum* koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir. Kullanılan bitki ekstresinin karaciğer ve böbrek dokusunda koruyucu etki göstermemiş olması dokuların farklı fizyolojik yapıya sahip olması, deney süresi ve CCl_4 'ün uygulama dozunun bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Sonuç olarak *M. neglectum*'un toprak üstü ve soğan kısımlarına ait etanolik liyofilize ekstresinin önemli fitokimyasal bileşikler içerdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, CCl_4 ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda ekstrenin mide lipit peroksidasyonunu

engellediği, antioksidan etki gösterdiği ve midevi hastalıklara karşı etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Acıbuca V, Budak DB. Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Cukurova J. Agric. Food Sci.* 2018;33(1):37-44.
- Ahmed B, Khan SA, Alam T. Synthesis and antihepatotoxic activity of some heterocyclic compounds containing the 1, 4-dioxane ring system. *Pharmazie.* 2003;58(3):173-6.
- Aköz M, Vatansev H, Gürbilek M, Akkuş İ, Vatansev C, Kaptanoğlu B. Glutasyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması. *Genel Tıp Derg.* 2000;10(1):1-6.
- Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;22:442-8.
- Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem.* 2006;31(2):51-6.
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants.* 2017;6(4):42-65.
- Anuk ÖO. Etil alkol ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda çınar (*Platanus orientalis* L.) yaprak infüzyonunun doku koruyucu rolü ve fitokimyasal içeriğinin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2018.
- Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 2009;161(2):105-21.
- Arika WM, Nyamai DW, Osano KO, Ngugi MP, Njagi ENM. Biochemical markers of *in vivo* hepatotoxicity. *J Clin Toxicol.* 2016;6(2):1-8.
- Arslan N, Baydar H, Kızıl S, Karık Ü, Şekeroğlu N, Gümüşçü A. Tıbbi aromatik bitkiler üretiminde değişimler ve yeni arayışlar [Bildiri]. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi*; 12-16 Ocak 2015; Ankara, Türkiye.
- Artajo LS, Romero MP, Morello JR, Motilva MJ. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds; evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:6079-88.
- Aslan R. Gelenekten günümüze tıbbi ve aromatik bitkiler. *Ayrıntı Dergisi.* 2019;7(73):60-6.
- Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M ve ark. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fak Derg.* 2019;26(3):362-9.
- Atınç M, Kalkan İ. Flavonoidler ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Aydın Gastronomy.* 2018;2(1):31-38.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014;2014:1–31.

- Bahmani M, Zargaran A. Ethno-botanical medicines used for urinary stones in the Urmia, Northwest Iran. *Eur J Integr Med.* 2015;7(6):657-62.
- Bai J, Yu N, Mu H, Dong L, Zhang X. Histidine protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress injury through the NF-κB pathway. *J. Cell. Biochem.* 2018;119(2):1637-45.
- Barone G, Corsaro MM, Lanzetta R, Parrilli M. Homoisoflavanones from *Muscari neglectum*. *Phytochemistry.* 1988;27(3):921-3.
- Bati B, Çelik I, Doğan A. Determination of hepatoprotective and antioxidant role of walnuts against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(2):1191-8.
- Baynes JW, Dominiczak MH. *Medical Biochemistry.* 3 th ed. London: Mosby Elsevier limited; 2009.
- Baytop T. *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü.* Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları; 2007.
- Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH ve ark. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(9):2969-89.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metab.: Clin. Exp.* 2000;49(2):3-8.
- Beutler E, Dubon OB, Kelly M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.
- Biodiversity and Health [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 12 Haziran 2021]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/biodiversity-and-health>
- Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations.* 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2013.
- Bokov DO, Riethmüller E. Anthocyanins Profile Characterization of Common Grape Hyacinth (*Muscari neglectum* Guss. ex Ten.) Flowers Growing in Hungary by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array Detector and Mass Spectrometry using the Electrospray Ionization Interface. *Qual. Assur. J.* 2020;11(1):15-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
- Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010;48(6):757-67.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Abelson J, Simon MI, Verdine GL, Pyle AM. *Methods in Enzymology.* ABD: Academic Press; 1978.
- Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2011;11(4):341-6.
- Bui TT, Park SY. A carbon dot-hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection. *Green Chem.* 2016;18(15):4245-53.

- Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, Kido D, Takeda K, Izumi Y ve ark. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. PLoS One. 2018;13(8):e0201855.
- Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. Free Radic. Biol. Med. 2017;107:2–12.
- Cánovas R, Cuartero M, Crespo GA. Modern creatinine (Bio) sensing: Challenges of point-of-care platforms. Biosens. Bioelectron. 2019;130:110-24.
- Center SA. Interpretation of liver enzymes. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2007;37(2):297-333.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. Bot. J. Linn. Soc. 2009;161(2):132-6.
- Christenhusz MJ, Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa. 2016;261(3):201-17.
- Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2001;10(4):141-52.
- Cortes VA, Busso D, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. Physiological and pathological implications of cholesterol. Front Biosci (Landmark Ed). 2014;19:416-28.
- Corticeiro S, Freitas R, Figueira E. The role of GSTs in the tolerance of *Rhizobium leguminosarum* to cadmium. Biometals. 2013;26(6):879-86.
- Cronquist A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. 3 th ed. London: Nelson; 1968.
- Çelik A, Varol R, Taner O, Dağdelen Y, Tugay F. Akut egzersizin futbolcularda antioksidan sistem parametrelerine etkisi. Spormetre. 2007;5(4):167-72.
- Çetinkalp Ş. Soru 1–Trigliserit nedir? Normal fizyolojideki yeri nedir?. Turk Kardiyol Dern Ars. 2017;45(1):1-63.
- Çetinkaya E. HPLC ve ilaç sanayinde uygulamaları. İnovatif Kimya Dergisi. 2014;16:7-9.
- Çizmeçi Can K. Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Ve Antiinflamatuvar Aktivitenin Tayini [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2019.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann. Ist. Super. Sanità. 2007;43(4):348-61.
- Dahlgren RMT. A revised system of classification of the angiosperms. Bot. J. Linn. Soc. 1980;80(2):91-124.
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313-52.
- de Boer JF, Kuipers F, Groen AK. Cholesterol Transport Revisited: A New Turbo Mechanism to Drive Cholesterol Excretion. Trends Endocrinol Metab. 2018;29(2):123-33.

- de Diego I, Peleg S, Fuchs B. The role of lipids in aging-related metabolic changes. *Chem Phys Lipids*. 2019;222:59-69.
- Delanaye P, Cavalier E, Pottel H. Serum Creatinine: Not So Simple! *Nephron*. 2017;136(4):302-8.
- Demirci Kayıran S, Eroğlu Özkan E. The ethnobotanical uses of Hyacinthaceae species growing in Turkey and a review of pharmacological activities. *Indian J. Tradit. Knowl*. 2017;16(2):243-50.
- Ding J, Karp JE, Emadi A. Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: Interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments. *Cancer Biomark*. 2017;19(4):353-63.
- Ding TM, Tian SJ, Zhang ZX, Gu DZ, Chen YF, Shi YH ve ark. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pharmacol. Biomed. Anal*. 2001;26:155-61.
- Doğan A, Anuk ÖO. Investigation of the phytochemical composition and antioxidant properties of chinara (*Platanus orientalis* L.) leaf infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Mol. Biol. Rep*. 2019;46(3):3049-61.
- Doğan A, Dalar A, Sadullahoglu C, Battal A, Uzun Y, Çelik İ, Demirel K. Investigation of the protective effects of horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Mol. Biol. Rep*. 2018;45(5):787-97.
- Doğan A, İlhan M, Battal A. Horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff.) prevents oxidative stress in carbon tetrachloride toxicity. Patel VB, Preedy VR. *Toxicology*. USA: Academic Press; 2021.
- Doğan A. Lyophilized Extract of the Horse Mushroom, *Agaricus arvensis* (Agaricomycetes), Delays Erythrocyte Hemolysis and Stabilizes Some Blood Parameters in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2018a;20(10):909-18.
- Doğan A. CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *Pholiota aurivella* liyofilize ekstrenin bazı biyokimyasal ve hematolojik parametrelere etkisi. *Mantar Dergisi*. 2018b;9(1):58-66.
- Đuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res*. 2010;59(4):459-69.
- Eker İ. What is *Muscari massayanum* and what is not? Second species born of confusion: *Muscari erzincanicum* (Asparagaceae, Scilloideae), a new species from Turkey. *Phytotaxa*. 2021;487(1):41-55.
- Ekici L, Sağdıç O. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda*. 2008;33(5):251-60.
- Ekpo DE, Joshua PE, Odiba AS, Nwodo OFC. Flavonoid-rich fraction of *Lasianthera africana* leaves alleviates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Drug Chem. Toxicol*. 2021;1-17.
- El-Hadary AE, Elsanhoty RM, Ramadan MF. *In vivo* protective effect of *Rosmarinus officinalis* oil against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats. *Pharma Nutrition*. 2019;9:100151.

- Eroğlu H. Türkiye’de yayılış gösteren *Muscari* Mill. (Asparagaceae) cinsi taksonlarına ait morfoloji, palinoloji ve tohum yüzeyi araştırmaları [Doktora tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2020.
- Eroğlu Özkan E, Demirci Kayıran S, Gülsoy Toplan G, Mataracı Kara E, Kurkcuoglu M. Identification of volatile compounds and antimicrobial activities of *Muscari neglectum* growing in Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 2018a;27(7):4674-78.
- Eroğlu Özkan E, Demirci Kayıran S, Taşkın T, Abudayyak M. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of *Muscari neglectum* growing in Turkey. *Marmara Pharm J.* 2018b;22(1):74-9.
- Eser B, Dinçel AS. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi.* 2018;2(2):51-7.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi.* 2011;11(1):52-67.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2013;6(2):233-65.
- Fikry EM, Ahmed AY. Hepatotoxicity and Antioxidants: An overview. *J. Drug Deliv. Ther.* 2019;9(3):1068-77.
- Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin. Drug Investig.* 2002;22(1):51-65.
- Galant AL, Kaufman RC, & Wilson JD. Glucose: Detection and analysis. *Food chem.* 2015;188:149-60.
- Garcia A, Barbas C. Metabolic Profiling Methods and Protocols. Metz TO. In *Metabolic Profiling.* ABD: Humana Press; 2011.
- Gedikli S, Şengül E. Ratlarda siklofosamid ile indüklenen hepatotoksisite üzerine kuersetinin etkileri. *Dicle Med J.* 2019;46(1):41-50.
- Genaro-Mattos TC, Maurício ÂQ, Rettori D, Alonso A, Hermes-Lima M. Antioxidant activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation—A chemical approach. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129963.
- Ghosh S, Sarkar A, Bhattacharyya S, Sil PC. Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway. *Front. pharmacol.* 2016; 2016/7:00481.
- Giglio F, Castiglione Morelli MA, Matera I, Sinisgalli C, Rossano R, Ostuni A. *Muscari comosum* L. Bulb Extracts Modulate Oxidative Stress and Redox Signaling in HepG2 Cells. *Molecules.* 2021;26(2):416-30.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I ve ark. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;70:204-12.
- Guarrera PM. Household dyeing plants and traditional uses in some areas of Italy. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2006;2(1):1-7.

- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol. Aspects Med. 2006;27(1):1-93.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; 2012.
- Gürdöl F. Tıbbi Biyokimya. 3 th ed. İstanbul: Nobel matbaacılık; 2018.
- Gürgöze SY, Şahin T, Durak M. Memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. Acta Vet Eurasia. 2007;33(1):43-9.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed. ABD: Oxford University Press; 2015. Chapter 2, Redox Chemistry: The Essentials; s.30-75.
- Hasar S, Doğan A, Demirel K. Determination of Tissue Protective and Antioxidant Activities of Two Medicinal Mushrooms from Turkey against CCl₄-Induced Experimental Oxidative Stress in Rats. Int J Med Mushrooms. 2020;22(7):671-81.
- He J, Huang B, Ban X, Tian J, Zhu L, Wang Y. In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*. J Ethnopharmacol. 2012;141(1):104-10.
- He W, Liu Y, Wamer WG, Yin JJ. Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. JFDA. 2014;22(1):49-63.
- Hirose M, Fukushima S, Shirai T, Hasegawa R, Kato T, Tanaka H ve ark. Stomach carcinogenicity of caffeic acid, sesamol and catechol in rats and mice. Jpn J Cancer Res. 1990;81(3):207-12.
- Hollingworth RM, Dong K. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM. Global Pesticide Resistance in Arthropods. ABD: Michigan State University: 2008.
- Işık M. *Salvia officinalis* L. Etanol Ekstraktının Antikolinergik ve Antioksidan Aktivitesi ve LC-MS/MS Analizi. Int. J. Life Sci. Biotechnology. 2020;3(1):51-61.
- İstifli ES, Demir E, Kaplan HM, Ateş KE, Doran F. Alpha-linolenic acid confers protection on mice renal cells against cisplatin-induced nephrotoxicity. Cytotechnology. 2019;71(5):905-14.
- Jafari A, Maassoumi AA. Synopsis of *Leopoldia*, *Muscari* and *Pseudomuscari* (Hyacinthaceae) in Iran, with *Leopoldia ghouschtchiensis* sp. nova. Ann. Bot. Fenn. 2011;48:396-400.
- Jiang HB, Huang J, Guo MJ, Zou P, Tian XQ. Recent advances in the study of natural homoisoflavonoids. Acta Pharm Sinica. 2007;42(2):118-26.
- Jin XL, Wang K, Li QQ, Tian WL, Xue XF, Wu LM ve ark. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Chinese propolis during palmitic acid-induced lipotoxicity in cultured hepatocytes. J. Funct. Foods. 2017;34:216-23.
- Kahraman A, Serteser M, Koken T. Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi. 2002;3(1):1-8.
- Kanani H, Chrysanthopoulos PK, Klapa MI. Standardizing gc-ms metabolomics. J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 2008;871(2):191-201.

- Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller. MAKU J. Health Sci. Inst. 2016a;4(1):50-9.
- Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. MAE Vet Fak Derg. 2016b;1(1):65-76.
- Karaköse M, Karaköse GÇ. Medicinal and aromatic plants of Esenli (Giresun) forest planning unit. Int. J. Second. Metab. 2017;4(3,1):285-305.
- Karaphillis E, Goldstein R, Murphy S, Qayyum R. Serum alanine aminotransferase levels and all-cause mortality. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017;29(3):284-8.
- Karlén T. Karyotpes and chromosome numbers of five species of *Muscari* (Liliaceae). Willdenovia. 1984;14:313-20.
- Kayacık OE, Kalaycı AG. Karaciğer İşlev Testleri. J Exp Clin Med. 2008;25(1):35-44.
- Kenan T, Semerci AB, İnceçayır D, Sağıroğlu MS. Antimicrobial activity of different flower extracts. CUPMAP. 2019;2(1):53-8.
- Kocabaş N. Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde Quercetin'in Koruyucu Etkisi [Yüksek lisans tezi]. Afyonkarahisar: Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi; 2008.
- Kocaman N, Dabak Ö. Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. Fırat Med J. 2015;20(3):128-32.
- Koç S, Alptekin D. Glutasyon S-transferaz genindeki delesyonların (GSTT1 ve GSTM1) koroner arter hastalığı ve akut miyokart infarktüsü ile ilişkisi. Cukurova Med J. 2014;39(2):256-61.
- Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G. Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi. 2017;5(1):26-42.
- Kolancı Ç. Temel ve Klinik Biyokimya. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2009.
- Kreider RB, Stout JR. Creatine in health and disease. Nutrients. 2021;13(2):447-73.
- Kumar P, Nagaraja, A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. Cold Spring Harb. Protoc. 2018;2018(6):095497.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Sci. World J. 2013;2013:1-16.
- Kuroda K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid and dicarboxylic acids on gastric ulceration in rats. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1977;226(2):324-30.
- Kuroda K, Terao K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid on hepatocarcinogenesis by thioacetamide in rats. J. Natl. Cancer Inst. 1987;79(5):1047-51.
- Lau WL, Vaziri ND. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. Clin Sci (Lond). 2017;131(1):3-12.
- Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA. Clinical review on triglycerides. Eur. Heart J. 2020;41(1):99-109.
- Lee JS, Adler L, Karathia H, Carmel N, Rabinovich S, Auslander N ve ark. Urea cycle dysregulation generates clinically relevant genomic and biochemical signatures. Cell. 2018;174(6):1559-70.

- Lee JS, Chang PY, Zhang Y, Kizer JR, Best LG, Howard BV. Triglyceride and HDL-C dyslipidemia and risks of coronary heart disease and ischemic stroke by glycemic dysregulation status: the strong heart study. *Diabetes care*. 2017;40(4):529-37.
- Li Q, Hu X, Xuan Y, Ying J, Fei Y, Rong J ve ark. Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2018;50(3):246-53.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D ve ark. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-72.
- Lim TK. *Muscari neglectum*. Lim TK. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Netherlands: Springer; 2014.
- Lindley J. The Vegetable Kingdom. London: Bradbury and Evans; 1846.
- Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P ve ark. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(3):678-92.
- Liu L, Liu Y, Zhao J, Xing X, Zhang C, Meng H. Neuroprotective Effects of D-(-)-Quinic Acid on Aluminum Chloride-Induced Dementia in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:1-10.
- Liu Z, Que S, Xu J, Peng T. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. *Int J Med Sci*. 2014;11(9):925-35.
- Llavanera M, Mateo-Otero Y, Bonet S, Barranco I, Fernández-Fuertes B, Yeste M. The triple role of glutathione S-transferases in mammalian male fertility. *Cell Mol Life Sci*. 2019;77(12):2331-42.
- Loewer HP. Jefferson's Garden. Pennsylvania: Stackpole Books; 2004.
- Loizzo M., Tundis R, Menichini F, Pugliese A, Bonesi M, Solimene U ve ark. Chelating, antioxidant and hypoglycaemic potential of *Muscari comosum* (L.) Mill. bulb extracts. *Int J Food Sci Nutr*. 2010;61(8):780-91.
- Macdougall PJ. Fruitful Synthesis of Science and Fiction. *Nature*. 2002;415(6867):13-4.
- Mahboubi M, Taghizadeh M. The antimicrobial and antioxidant activity of *Muscari neglectum* flower ethanol extract. *Herba Pol*. 2016;62(4):39-48.
- Mahmoodzadeh Y, Mazani M, Rezagholizadeh L. Hepatoprotective effect of methanolic *Tanacetum parthenium* extract on CCl₄-induced liver damage in rats. *Toxicol. Rep*. 2017;4:455-62.
- Mahmoud AM, Hozayen WG, Hasan IH, Shaban E, Bin-Jumah M. Umbelliferone ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in rats by upregulating PPAR γ and attenuating oxidative stress, inflammation, and TGF- β 1/Smad3 signaling. *Inflammation*. 2019;42(3):1103-16.
- Mahmoodally MF, Zengin G, Sinan KI, Yıldıztuğay E, Lobine D, Ouelbani R ve ark. A comprehensive evaluation of the chemical profiles and biological properties of six geophytes from Turkey: Sources of bioactive compounds for novel nutraceuticals. *Food Res. Int*. 2021;140:110068.
- Mammadov R. Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler. Ankara: Nobel Press; 2014.

- Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione S-transferase (Human Placenta). *Method. Enzymol.* 1981;77:231-5.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal.* 2008;275(15):3959-70.
- März W, Kleber ME, Scharnagl H, Speer T, Zewinger S, Ritsch A ve ark. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin. Res. Cardiol.* 2017;106(9):663-75.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.
- Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fak Derg.* 2005;7(3):30-9.
- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Van Vet J.* 2004;15(1):91-6.
- Miao L, Clair DKS. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2009;47(4):344-56.
- Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB life.* 2013;65(11):904-10.
- Miller P. *The Gardener's Dictionary.* 4 th ed. London: Bradbury and Evans; 1754.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuena MA. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000;7:109-14.
- Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, McAuley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res Rev.* 2016;27:108-24.
- Mradu G, Saumyakanti S, Sohini M, Arup M. HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 2012;4(3):162-7.
- Mulholland DA, Schwikkard SL, Crouch NR. The chemistry and biological activity of the Hyacinthaceae. *Nat. Prod. Rep.* 2013;30(9):1165-1210.
- Musdal Y, Bolelli TE, Bolelli K, Yilmaz S, Ceyhan D, Hegazy U ve ark. Inhibition of human glutathione transferase P1-1 by novel benzazole derivatives. *Turkish J. Biochem.* 2012;37(4):431-6.
- Mustafa RA, Hamid AA, Mohamed S, Bakar FA. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *J. Food Sci.* 2010;75(1):28-35.
- Muthu C, Ayyanar M, Raja N, Ignacimuthu S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2006;2(1):1-10.
- Narwal V, Deswal R, Batra B, Kalra V, Hooda R, Sharma M ve ark. Cholesterol biosensors: A review. *Steroids.* 2019;143:6-17.
- Nasrabadi M, Halimi M, Nadaf M. Phytochemical screening and chemical composition of extract of *Muscari neglectum*. *Middle-East J Sci Res.* 2013;14(4):566-9.

- Negro M, Avanzato I, D'Antona G. Creatine in Skeletal Muscle Physiology. Nabavi S, Silva A. In Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. ABD: Academic Press; 2019.
- Oestreicher J, Morgan B. Glutathione: Subcellular distribution and membrane transport. Biochem Cell Biol. 2018;97(3):270-89.
- Okutan H, Özçelik N, Yılmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. Clin. Biochem. 2005;38(2):191-6.
- Olaleye OO, Sofidiya MO, Ogundipe OK. Protective effect of the fruit of *Dialium guineense* Willd (Fabaceae) against oxidative stress. West African Journal of Pharmacy. 2019;30(2):104-13.
- Öncü T. Türkiye’de yetişen kapari bitkisinin kuersetin ve rutin içeriğinin kromatografik ve spektroskopik yöntemler ile tayini [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2016.
- Özay C. Ege Bölgesi’ndeki bazı *Alyssum* L. taksonlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerinin karakterizasyonu [Doktora tezi]. Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2015.
- Özcan MM, Doğu S, Uslu N. Effect of species on total phenol, antioxidant activity and phenolic compounds of different wild onion bulbs. J. Food Meas. Charact. 2018;12(2):902-5.
- Özkan E. Down Sendromu’nun tanısına yönelik seçilmiş metabolitlerin gaz kromatografisi kütle spektrometrisi ile tayini [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967;70(1):158-69.
- Perl-Treves R, Perl A. Molecular oxygen and its reactive derivatives oxidative stress in plants. Taylor & Francis Inc. 2002;2002:1-31.
- Petrovska BB. Historical review of medicinal plants’ usage. Pharmacogn. Rev. 2012;6(11):1-5.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015;30(1):11-26.
- Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. Rosenthal W. High Density Lipoproteins. London: Springer; 2015.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur J Med Chem. 2015;97:55-74.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V ve ark. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017;2017:1-13.
- Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J. Med. Res. 2006;137(2):491-504.

- Pundir CS, Jakhar S, Narwal V. Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* 2019;123:36-50.
- Rader DJ, Tall AR. Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nat. Med.* 2012;18(9):1344-6.
- Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE ve ark. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014;371(25):2383-93.
- Sanei M, Ghasemnezhad A, Sadeghi Mahounak A, Masoumi M, Ghorbani K. Screen of Antioxidant Activity Leads to Recognition of High Valuable Medicinal Plants: A Case Study of Paveh and Ormanat, West of Iran. *J Genet Resour.* 2021;7(1):87-105.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, R  m  sy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(4):287-306.
- Schippmann UWE, Leaman D, Cunningham AB. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. Bogers RJ, Craker LE, Lange D. *Medicinal and Aromatic Plants.* Netherlands: Springer; 2006.
- Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *F   Sağ. Bil. Vet. Dergisi.* 2014;28(1):49-56.
- Shah S, Iqbal M, Karam J, Salifu M, McFarlane SI. Oxidative stress, glucose metabolism, and the prevention of type 2 diabetes: pathophysiological insights. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(7):911-29.
- Shahidi F, Naczsk M. *Food phenolics.* USA: Technomic Pub Co; 1995.
- Shakya AK. Medicinal plants: Future source of new drugs. *Int. J. Herb. Med.* 2016;4(4):59-64.
- Sheng-Ji P. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. *Pharm. Biol.* 2001;39(1):74-9.
- Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 2017;86:715-48.
- Siliğ Y, Taş A, Pınarbaşı H. Manganese-superoxide dismutase (MnSOD) polymorphisms/Manganez-süperoksit dismutaz (MnSOD) polimorfizmi. *Turkish J. Biochem.* 2015;40(2):163-8.
- Silybum marianum* (L.) Gaertner [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 09 Haziran 2021]. <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/112>
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Diğer Yöntemler. Kılıç E, Yılmaz H. *Enstrümantal Analiz   lkeleri.* 6 th ed. Ankara: Bilim Yayınları; 2013.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic.* 1977;28:49-55.
- Sönmez Y. Epilepsi Hastalarında Eser Element Düzeyi, Tiyol-Disülfid Dengesi, Hücre    i Okside ve Redükte Glutasyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi [Doktora tezi]. Ankara: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi; 2019.
- Speta F. *Hyacinthaceae.* Kubitzki K. *The Families and Genera of Vascular Plants, Monocotyledons.* 3 th ed. Berlin: Springer; 1998.

- Suzek H, Çelik I, Doğan A, Yildirim S. Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharm. Biol.* 2016;54(3):451-7.
- Suzek H, Çelik I, Doğan A. Nephroprotective hepatoprotective potential and antioxidant role of carob pods (*Cerotonia siliqua* L.) against carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. *Indian J Pharm Educ Res.* 2017;51(2):312-20.
- Süleyman H, Gül V, Erhan E. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi.* 2018;1(1):1-4.
- Şenkul Ç, Kaya S. Türkiye endemik bitkilerinin coğrafi dağılışı. *Türk Coğrafya Dergisi.* 2017;69:109-20.
- Tekeli H, Bildik A. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında glutatyon (GSH) ve glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine n-asetil sisteinin etkisi. *BAUN Sağ Bil Derg.* 2013;5(2):83-7.
- Thomas E, Anandan R. GC-MS analysis of phytochemical compounds present in the rhizomes of *Nervilia aragoana* Gaud. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2013;6(3):68-74.
- Tong J, Yao X, Zeng H, Zhou G, Chen Y, Ma B ve ark. Hepatoprotective activity of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds *in vitro* and *in vivo* carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol.* 2015;174:355-63.
- Tsao R, Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition:towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2003;1018:29-40.
- Tungmunthum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines.* 2018;5(3):93-108.
- Turfan N, Kurnaz A, Alay M, Sarıyıldız T. Farklı koşullarda saklanan Taşköprü sarımsağında bazı kimyasal özelliklerin belirlenmesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi.* 2016;16(2):427-37.
- Tüfekçi AR, Akşit H, Gül F, Demirtaş İ. Determination of Phenolic Profile of *Cirsium arvense* (L.) Scop. Subsp. *vestitum* (Wimmer et Grab.) Petrak Plant. *Eurasian J Bi Chem Sci.* 2018;1(2):33-6.
- Türker AU, Usta C. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Nat. Prod. Res.* 2008;22(2):136-146.
- Uğurlu E, Secmen O. Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia.* 2008;79(2):126-31.
- Usher G. A dictionary of plants used by man. London: Constable and Company Ltd; 1974.
- Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. Gürdöl F. Tıbbi Biyokimya. 3 th ed. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri; 2018.
- Vaghasiya Y, Dave R, Chanda S. Phytochemical analysis of some medicinal plants from western region of India. *Res. J. Med. Plant.* 2011;5(5):567-76.

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;266(1):37-56.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006;160(1):1-40.
- van Beek JH, de Moor MH, de Geus EJ, Lubke GH, Vink JM, Willemssen G ve ark. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. *Behav. Genet.* 2013;43(4):329-39.
- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, González-Rubio MGL ve ark. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J. Hepatol.* 2014;6(3):144-9.
- Vessal G, Akmalı M, Najafi P, Moein MR, Sagheb MM. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal failure.* 2010;32(6):733-9.
- Vural DF. Karbontetraklorür (CCl₄) uygulanmış sıçanların gastrocnemius kasına melatoninin etkisi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2015.
- Vutukuru SS, Prabhath NA, Raghavender M, Yerramilli A. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int J Environ Res Public Health.* 2007;4(3):224-7.
- Wang H, Ran J, Jiang T. Urea. Yang B, Sands J. Urea Transporters. Dordrecht: Springer; 2014.
- Weber Lutz WD, Boll M, Stampfl A. Hepato toxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbontetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 2003;33:105-36.
- Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J. Lipid Res.* 2010;51(8):2032-57.
- Winczura A, Zdzałik D, Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic. Res.* 2012;46(4):442-59.
- Yavaş U. Yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan bazı ilaç etken maddelerinin UV/VIS spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) yöntemlerle incelenmesi ve elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2019.
- Yemitan OK, Izegebu MC. Protective effects of Zingiber officinale (Zingiberaceae) against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 2006;20(11):997-1002.
- Yıldız H, Baysal T. Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi.* 2003;7(14):29-35.
- Yıldız T. Tavuk etinde antibiyotik kalıntılarının HPLC yöntemiyle belirlenmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi; 2014.
- Yılmaz MA. Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Ind Crops Prod.* 2020;149:112347.

Young IS. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001;54(3):176–86.
Zhao L. Singlet oxygen. *Biology Program B-180 Med Labs.* 2001;72(222):1-10.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kesin Sonuç Raporu





T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



YÜKSEK LİSANS TEZİ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	CCl ₄ ile Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda Arap Üzümlü (<i>Muscari neglectum</i> Guss. Ex Ten.) Bitki Ekstraktının Fitokimyasal İçeriği ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
16	2	59	5	86
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
Turnitin		25 /06 / 2021	%9	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Teşekkür hariç, - Kaynakça hariç, - İçindekiler hariç, - Alıntılar hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Ayşegül EROĞLU				

Öğrencinin Adı Soyadı	Ayşegül EROĞLU
Anabilim Dalı	Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı
Öğrenci No	18930006006
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Doç. Dr. Hamit Hakan ALP
--	---

Ek 3. LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri (Yılmaz, 2020)

No	Analytes	RT ^d	M.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	Equation	r^{2d}	RSD% ^e		Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Recovery (%)		U^g	Gr. No ⁱ
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
1	Quinic acid	3.0	190.8	93.0	Neg	$y = -0.0129989 + 2.97989 \times$	0.996	0.69	0.51	0.1-5	25.7/33.3	1.0011	1.0083	0.0372	1
2	Fumaric acid	3.9	115.2	40.9	Neg	$y = -0.0817862 + 1.03467 \times$	0.995	1.05	1.02	1-50	135.7/167.9	0.9963	1.0016	0.0091	1
3	Aconitic acid	4.0	172.8	129.0	Neg	$y = -0.7014530 + 32.9994 \times$	0.971	2.07	0.93	0.1-5	16.4/31.4	0.9968	1.0068	0.0247	1
4	Gallic acid	4.4	168.8	79.0	Neg	$y = 0.0547697 + 20.8152 \times$	0.999	1.60	0.81	0.1-5	13.2/17.0	1.0010	0.9947	0.0112	1
5	Epigallocatechin	6.7	304.8	219.0	Neg	$y = -0.00494986 + 0.0483704 \times$	0.998	1.22	0.73	1-50	237.5/265.9	0.9969	1.0040	0.0184	3
6	Protocatechuic acid	6.8	152.8	108.0	Neg	$y = 0.211373 + 12.8622 \times$	0.957	1.43	0.76	0.1-5	21.9/38.6	0.9972	1.0055	0.0350	1
7	Catechin	7.4	288.8	203.1	Neg	$y = -0.00370053 + 0.431369 \times$	0.999	2.14	1.08	0.2-10	55.0/78.0	1.0024	1.0045	0.0221	3
8	Gentisic acid	8.3	152.8	109.0	Neg	$y = -0.0238983 + 12.1494 \times$	0.997	1.81	1.22	0.1-5	18.5/28.2	0.9963	1.0077	0.0167	1
9	Chlorogenic acid	8.4	353.0	85.0	Neg	$y = 0.289983 + 36.3926 \times$	0.995	2.15	1.52	0.1-5	13.1/17.6	1.0000	1.0023	0.0213	1
10	Protocatechuic aldehyde	8.5	137.2	92.0	Neg	$y = 0.257085 + 25.4657 \times$	0.996	2.08	0.57	0.1-5	15.4/22.2	1.0002	0.9988	0.0396	1
11	Tannic acid	9.2	182.8	78.0	Neg	$y = 0.0126307 + 26.9263 \times$	0.999	2.40	1.16	0.05-2.5	15.3/22.7	0.9970	0.9950	0.0190	1
12	Epigallocatechin gallate	9.4	457.0	305.1	Neg	$y = -0.0380744 + 1.61233 \times$	0.999	1.30	0.63	0.2-10	61.0/86.0	0.9981	1.0079	0.0147	3
13	1,5-dicaffeoylquinic acid	9.8	515.0	191.0	Neg	$y = -0.0164044 + 16.6535 \times$	0.999	2.42	1.48	0.1-5	5.8/9.4	0.9983	0.9997	0.0306	1
14	4-OH Benzoic acid	10.5	137.2	65.0	Neg	$y = -0.0240747 + 5.06492 \times$	0.999	1.24	0.97	0.2-10	68.4/88.1	1.0032	1.0068	0.0237	1
15	Epicatechin	11.6	289.0	203.0	Neg	$y = -0.0172078 + 0.0833424 \times$	0.996	1.47	0.62	1-50	139.6/161.6	1.0013	1.0012	0.0221	3
16	Vanillic acid	11.8	166.8	108.0	Neg	$y = -0.0480183 + 0.779564 \times$	0.999	1.92	0.76	1-50	141.9/164.9	1.0022	0.9998	0.0145	1
17	Caffeic acid	12.1	179.0	134.0	Neg	$y = 0.120319 + 95.4610 \times$	0.999	1.11	1.25	0.05-2.5	7.7/9.5	1.0015	1.0042	0.0152	1
18	Syringic acid	12.6	196.8	166.9	Neg	$y = -0.0458599 + 0.663948 \times$	0.998	1.18	1.09	1-50	82.3/104.5	1.0006	1.0072	0.0129	1
19	Vanillin	13.9	153.1	125.0	Poz	$y = 0.00185898 + 20.7382 \times$	0.996	1.10	0.85	0.1-5	24.5/30.4	1.0009	0.9967	0.0122	1
20	Syringic aldehyde	14.6	181.0	151.1	Neg	$y = -0.0128684 + 7.90153 \times$	0.999	2.51	0.77	0.4-20	19.7/28.0	1.0001	0.9964	0.0215	1
21	Daidzin	15.2	417.1	199.0	Poz	$y = 9.45747 + 152.338 \times$	0.996	2.25	1.32	0.05-2.5	7.0/9.5	0.9955	1.0017	0.0202	2
22	Epicatechin gallate	15.5	441.0	289.0	Neg	$y = -0.0142216 + 1.06768 \times$	0.997	1.63	1.28	0.1-5	19.5/28.5	0.9984	0.9946	0.0229	3
23	Piceid	17.2	391.0	135/106.9	Poz	$y = 0.00772525 + 25.4181 \times$	0.999	1.94	1.16	0.05-2.5	13.8/17.8	1.0042	0.9979	0.0199	1
24	<i>p</i> -Coumaric acid	17.8	163.0	93.0	Neg	$y = 0.0249034 + 18.5180 \times$	0.999	1.92	1.43	0.1-5	25.9/34.9	1.0049	1.0001	0.0194	1
25	Ferulic acid-D3-IS ^h	18.8	196.2	152.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.0170	1
26	Ferulic acid	18.8	192.8	149.0	Neg	$y = -0.0735254 + 1.34476 \times$	0.999	1.44	0.53	1-50	11.8/15.6	0.9951	0.9976	0.0181	1
27	Sinapic acid	18.9	222.8	193.0	Neg	$y = -0.0929932 + 0.836324 \times$	0.999	1.45	0.52	0.2-10	65.2/82.3	1.0031	1.0037	0.0317	1
28	Coumarin	20.9	146.9	103.1	Poz	$y = 0.0633397 + 136.508 \times$	0.999	2.11	1.54	0.05-2.5	214.2/247.3	0.9950	0.9958	0.0383	1

^aR.T.: Retention time, ^bMI (m/z): Molecular ions of the standard analytes (m/z ratio), ^cFI (m/z): Fragment ions ^d r^2 : Coefficient of determination, ^eRSD: Relative standard deviation, ^fLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/quantification, ^g U (%): percent relative uncertainty at 95% confidence level ($k = 2$), ^hIS: Internal standard, ⁱGr. No: Represents grouping of internal standards, these numbers indicate which IS stands for which phenolic compound. Ek 3'ün devamı bir sonraki sayfadadır.

Ek 3. LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri (Yılmaz, 2020) (devamı)

No	Analytes	RT ^a	M.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	Equation	r^{2d}	RSD% ^e		Linearity Range (mg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^f	Recovery (%)		U ^g	Gr. No
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
29	Salicylic acid	21.8	137.2	65.0	Neg	$y=0.239287+153.659 \times$	0.999	1.48	1.18	0.05-2.5	6.0/8.3	0.9950	0.9998	0.0158	1
30	Cynaroside	23.7	447.0	284.0	Neg	$y=0.280246+6.13360 \times$	0.997	1.56	1.12	0.05-2.5	12.1/16.0	1.0072	1.0002	0.0366	2
31	Miquelianin	24.1	477.0	150.9	Neg	$y=-0.00991585+5.50334 \times$	0.999	1.31	0.95	0.1-5	10.6/14.7	0.9934	0.9965	0.0220	2
32	Rutin-D3-IS ^h	25.5	612.2	304.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2
33	Rutin	25.6	608.9	301.0	Neg	$y=-0.0771907+2.89868 \times$	0.999	1.38	1.09	0.1-5	15.7/22.7	0.9977	1.0033	0.0247	2
34	isoquercitrin	25.6	463.0	271.0	Neg	$y=-0.111120+4.10546 \times$	0.998	2.13	0.78	0.1-5	8.7/13.5	1.0057	0.9963	0.0220	2
35	Hesperidin	25.8	611.2	449.0	Poz	$y=0.139055+13.2785 \times$	0.999	1.84	1.35	0.1-5	19.0/26.0	0.9967	1.0043	0.0335	2
36	o-Coumaric acid	26.1	162.8	93.0	Neg	$y=0.00837193+11.2147 \times$	0.999	2.11	1.46	0.1-5	31.8/40.4	1.0044	0.9986	0.0147	1
37	Genistin	26.3	431.0	239.0	Neg	$y=1.65808+7.57459 \times$	0.991	2.01	1.28	0.1-5	14.9/21.7	1.0062	1.0047	0.0083	2
38	Rosmarinic acid	26.6	359.0	197.0	Neg	$y=-0.0117238+8.04377 \times$	0.999	1.24	0.86	0.1-5	16.2/21.2	1.0056	1.0002	0.0130	1
39	Ellagic acid	27.6	301.0	284.0	Neg	$y=0.00877034+0.663741 \times$	0.999	1.57	1.23	0.4-20	56.9/71.0	1.0005	1.0048	0.0364	1
40	Cosmosiin	28.2	431.0	269.0	Neg	$y=-0.708662+8.62498 \times$	0.998	1.65	1.30	0.1-5	6.3/9.2	0.9940	0.9973	0.0083	2
41	Quercitrin	29.8	447.0	301.0	Neg	$y=-0.00153274+3.20368 \times$	0.999	2.24	1.16	0.1-5	4.8/6.4	0.9960	0.9978	0.0268	2
42	Astragalin	30.4	447.0	255.0	Neg	$y=0.00825333+3.51189 \times$	0.999	2.08	1.72	0.1-5	6.6/8.2	0.9968	0.9957	0.0114	2
43	Nicotiflorin	30.6	592.9	255.0/284.0	Neg	$y=0.00499333+2.62351 \times$	0.999	1.48	1.23	0.05-2.5	11.9/16.7	0.9954	1.0044	0.0108	2
44	Fisetin	30.6	285.0	163.0	Neg	$y=0.0365705+8.09472 \times$	0.999	1.75	1.19	0.1-5	10.1/12.7	0.9980	1.0042	0.0231	3
45	Daidzein	34.0	253.0	223.0	Neg	$y=-0.0329252+6.23004 \times$	0.999	2.18	1.73	0.1-5	9.8/11.6	0.9926	0.9963	0.0370	3
46	Quercetin-D3-IS ^h	35.6	304.0	275.9	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3
47	Quercetin	35.7	301.0	272.9	Neg	$y=+0.00597342+3.39417 \times$	0.999	1.89	1.38	0.1-5	15.5/19.0	0.9967	0.9971	0.0175	3
48	Naringenin	35.9	270.9	119.0	Neg	$y=-0.00393403+14.6424 \times$	0.999	2.34	1.69	0.1-5	2.6/3.9	1.0062	1.0020	0.0392	3
49	Hesperetin	36.7	301.0	136.0/286.0	Neg	$y=+0.0442350+6.07160 \times$	0.999	2.47	2.13	0.1-5	7.1/9.1	0.9998	0.9963	0.0321	3
50	Luteolin	36.7	284.8	151.0/175.0	Neg	$y=-0.0541723+30.7422 \times$	0.999	1.67	1.28	0.05-2.5	2.6/4.1	0.9952	1.0029	0.0313	3
51	Genistein	36.9	269.0	135.0	Neg	$y=-0.00507501+12.1933 \times$	0.999	1.48	1.19	0.05-2.5	3.7/5.3	1.0069	1.0012	0.0337	3
52	Kaempferol	37.9	285.0	239.0	Neg	$y=-0.00459557+3.13754 \times$	0.999	1.49	1.26	0.05-2.5	10.2/15.4	0.9992	0.9990	0.0212	3
53	Apigenin	38.2	268.8	151.0/149.0	Neg	$y=0.119018+34.8730 \times$	0.998	1.17	0.96	0.05-2.5	1.3/2.0	0.9985	1.0003	0.0178	3
54	Amentoflavone	39.7	537.0	417.0	Neg	$y=0.727280+33.3658 \times$	0.992	1.35	1.12	0.05-2.5	2.8/5.1	0.9991	1.0044	0.0340	3
55	Chrysin	40.5	252.8	145.0/119.0	Neg	$y=-0.0777300+18.8873 \times$	0.999	1.46	1.21	0.05-2.5	1.5/2.8	0.9922	1.0050	0.0323	3
56	Acacetin	40.7	283.0	239.0	Neg	$y=-0.559818+163.062 \times$	0.997	1.67	1.28	0.02-1	1.5/2.5	0.9949	1.0011	0.0363	3

^aR.T.: Retention time, ^bMI (m/z): Molecular ions of the standard analytes (m/z ratio), ^cFI (m/z): Fragment ions ^d r^2 : Coefficient of determination, ^eRSD: Relative standard deviation, ^fLOD/LOQ (µg/L): Limit of detection/quantification, ^gU (%): percent relative uncertainty at 95% confidence level ($k = 2$), ^hIS: Internal standard, ⁱGr. No: Represents grouping of internal standards, these numbers indicate which IS stands for which phenolic compound.

Ek 4. LC-MS/MS Standart Fenolik Bileşikler Kromatogramı (Yılmaz, 2020)

