

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELLAJİK ASİTİN KSENOBİYOTİK METABOLİZMASI ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN VE İLAÇ-DİYET ETKİLEŞİM POTANSİYELİNİN  
MOLEKÜLER YAKLAŞIMLAR İLE AYDINLATILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Gurbet ÇELİK**

**Ana Bilim Dalı: BİYOLOJİ**

**Prof. Dr. Alaattin ŞEN**

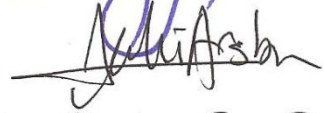
**TEMMUZ 2012**

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 091461025 nolu öğrencisi Gurbet CELİK tarafından hazırlanan “Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Alaattin ŞEN (PAÜ)



Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN (PAÜ)



Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR (DEÜ)



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.08/2012 tarih ve ...19/25.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

: 

Öğrenci Adı Soyadı

: Gurbet ÇELİK

## ÖNSÖZ

Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması çalışması, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve tez çalışması süresince benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan, deneyim olarak yetişmemde çok büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e ve laboratuvar çalışmalarında bilgi ve birikimini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN'a şükranlarımı sunarım.

Gerçek Zamanlı PCR çalışmalarında bize laboratuvarını açan, tez çalışmalarımın yapılmasında büyük emeği olan Prof. Dr. Orhan ADALI'ya ve tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyem Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında ve günlük hayatımda desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen Araştırma Görevlisi Aslı SEMİZ'e, RT-PCR çalışmalarında ki yardımlarından dolayı Araştırma Görevlisi Serdar KARAKURT'a teşekkür ederim.

Maddi desteği sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2010FBE081) ve TÜBİTAK'a (109R012) teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını eksik etmeyen tüm bölüm hocalarıma, laboratuvar çalışma arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan ve beni bu günlere özveriyle getiren aileme sonsuz teşekkürler.

Temmuz 2012

Gurbet ÇELİK

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Sitokrom P450 (CYP450) ve Fitokimyasal Etkileşimleri .....	2
1.2. Faz II Enzimleri [Glutasyon S-Transferazlar (GST) ve Kinon Redüktazlar (NQO1)] ve Fitokimyasal Etkileşimleri.....	5
1.3. Antioksidan Enzimler ve Fitokimyasal Etkileşimleri .....	6
1.4. Antikarsinojenik Etki ve Fitokimyasal Etkileşimleri .....	7
1.5. Fitokimyasallar .....	8
1.6. Ellajik Asit .....	9
1.7. Çalışmanın Amacı .....	12
<b>2. MATERYAL ve METOT</b> .....	14
2.1. Materyal.....	14
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	14
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	14
2.1.3. Dokuların Temini .....	15
2.2. Metotlar .....	15
2.2.1. Enjeksiyon Aşaması- <i>in vivo</i> Hayvan Çalışmaları.....	15
2.2.2. Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Saptanması .....	16
2.2.2.1. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması .....	16
2.2.2.1.1. Sitolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi .....	16
2.2.2.1.2. Protein Tayini .....	17
2.2.2.1.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Tayini (CYP2E1) .....	17
2.2.2.1.4. N-Demetilaz Aktivite Tayinleri.....	18
2.2.2.1.4. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktiviteleri Tayini .....	21
2.2.2.1.5. Sitolik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini.....	22
2.2.2.1.6. Sitolik Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivite Tayini .....	23
2.2.2.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması.....	24
2.2.2.2.1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini.....	24
2.2.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini .....	24
2.2.2.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini .....	25
2.2.2.3. Diagnostik (Sitolik) Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması .....	26
2.2.2.3.1. Serum Aminotransferazların (Aspartat ve Alanin) Tayini: (AST ve ALT).....	26
2.2.2.4. Ellajik Asitin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması .....	26
2.2.2.4.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi .....	26
2.2.2.4.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi .....	28
2.2.2.5. Ellajik Asitin Genotoksik Etkilerinin Saptanması .....	30

2.2.2.5.1. Hücre Kültürü ve Ellajik Asitin Uygulanması .....	30
2.2.2.5.2. Ellajik Asitin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi .....	31
2.2.2.6. İstatiksel Analizler .....	32
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
3.1. Enjeksiyon Aşaması – <i>in vivo</i> Hayvan Çalışmaları .....	33
3.2. Fraksiyonların Protein Değerleri.....	34
3.3. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması .....	35
3.3.1. CYP1A Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi.....	36
3.3.1.1. EROD.....	36
3.3.1.2. MROD.....	37
3.3.1.3. Kafein (C3ND) .....	39
3.3.2. CYP2B Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi.....	41
3.3.2.1. Benzfetamin (BPND) .....	41
3.3.2.2. Etilmorfin (EmND).....	43
3.3.2.3. BROD.....	45
3.3.2.4. PROD .....	47
3.3.3. CYP2C Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi.....	49
3.3.3.1. Aminopiren (APND).....	49
3.3.4. CYP2E Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi .....	51
3.3.4.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesi (A4H) .....	51
3.3.4.2. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA) .....	53
3.3.5. CYP3A Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi.....	55
3.3.5.1. Eritromisin (ERND).....	55
3.3.6. CYP19 Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi .....	57
3.3.6.1. Aromataz Aktivitesi (DBFOD).....	57
3.3.7. Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi .....	59
3.3.8. Glutasyon S-Transferaz Aktiviteleri Üzerine Ellajik Asitin Etkisi .....	61
3.3.8.1. GST- CDNB .....	61
3.3.8.2. GST- DCNB .....	64
3.3.8.3. GST- EA.....	66
3.3.9. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Ellajik Asitin Etkisi .....	67
3.3.9.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi .....	67
3.3.9.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivitesi.....	69
3.3.9.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi .....	71
3.3.10. Diagnostik Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması.....	73
3.3.10.1. Serum Aminotransferazların Tayini: (AST ve ALT).....	73
3.3.11. Ellajik Asitin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması .....	74
3.3.11.1. Protein ve mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi...74	
3.3.12. Hücre Kültürü ve Ellajik Asitin Uygulanması.....	81
3.3.12.1. Ellajik Asitin Değişik Hücre Hatlarına Sitotoksik Etkileri .....	81
3.3.12.1.1. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri.....	81
3.3.12.1.2. İnsan Fibroblastik 3T3 hücre hattı .....	82
3.3.12.1.3. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücre hattı.....	83
3.3.12.1.4. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücre hattı.....	84
3.3.12.2. Ellajik Asitin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi.....	84
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>87</b>
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>100</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>101</b>

## KISALTMALAR

<b>CYP450</b>	: Sitokrom P450
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>BSA</b>	: Sığır serum albumin
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu
<b>GSH</b>	: Glutasyon indirgenmiş formu
<b>β-NADPH</b>	: β-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>PMSF</b>	: Fenilmetan sülfonil florid
<b>G6PD</b>	: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
<b>Tween 20</b>	: Polioksietilen-sarbiton-monolaurat
<b>TEMED</b>	: N',N',N'-Tetrametil-etilen-diamin
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>ε-ACA</b>	: ε-aminokaproik asit
<b>BHT</b>	: Bütilhidroksitoluen
<b>pAP</b>	: p-aminofenol
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>TCA</b>	: Trikloroasetikasit
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Sodyum bikarbonat
<b>EmND</b>	: Etilmorfin N-demetilaz
<b>ErND</b>	: Eritromisin N-demetilaz
<b>NDMA</b>	: N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz
<b>CN3D</b>	: Kafein N-demetilaz
<b>APND</b>	: Aminopiren N-demetilaz
<b>A4H</b>	: Anilin 4-hidroksilaz
<b>EROD</b>	: Etoksirezorufin O-deetilaz
<b>PROD</b>	: Pentiloksirezorufin O-depentilaz
<b>MROD</b>	: Metoksirezorufin O-demetilaz
<b>BROD</b>	: Benziloksirezorufin O-debenzilaz
<b>GST-CDNB</b>	: Glutasyon S-transferaz 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
<b>GST-DCNB</b>	: Glutasyon S-transferaz 1,2-dikloro-4-nitrobenzen
<b>GST-EA</b>	: Glutasyon S-transferaz etakrinik asit
<b>KPi</b>	: Potasyum fosfat
<b>DCPIP</b>	: 6 diklorofenolindofenol
<b>NQO1</b>	: Kinon redüktaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GPX</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>HRP</b>	: Horseradish peroksidaz
<b>KCl</b>	: Potasyum klorid
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür

<b>DDT</b>	: Dikloro difenil trikloroethan
<b>FCS</b>	: Fetal inek serumu
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>NDMA</b>	: N-Nitrosodimetilamin N-demetilaz
<b>EAT</b>	: Ellajik asit



## TABLO LİSTESİ

### Tablolar

2.1: N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri. ....	20
2.2: EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği. ....	22
2.3: Tipik GST-CDNB, GST-DCNB, GST-EA aktiviteleri ölçüm karışımının içeriği. ....	22
2.4: Tipik NQO1-DCPIP aktivite ölçüm karışımının içeriği. ....	23
2.5: Tipik bir katalaz aktivite ölçüm reaksiyonunun içeriği. ....	24
2.6: Tipik bir glutasyon peroksidaz aktivite ölçümünün içeriği. ....	25
2.7: Tipik bir SOD aktivite ölçümünün içeriği. ....	25
2.8: SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları. ....	27
2.9: Seçilen CYP450 genleri için tanımlanan primer dizileri. ....	30
3.1: Denek bilgileri. ....	33
3.2: Sıçan karaciğer fraksiyonlarının protein miktarları. ....	35
3.3: EROD aktivitesi. ....	36
3.4: MROD aktivitesi. ....	38
3.5: Kafein aktivitesi (C3ND). ....	40
3.6: Benzfetamin aktivitesi (BPND). ....	42
3.7: Etilmorfin aktivitesi (EmND). ....	44
3.8: BROD aktivitesi. ....	46
3.9: PROD aktivitesi. ....	48
3.10: Aminopiren aktivitesi (APND). ....	50
3.11: Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H). ....	52
3.12: NDMA aktivitesi. ....	54
3.13: Eritromisin aktivitesi (ErND). ....	56
3.14: Aromataz aktivitesi (DBFOD). ....	58
3.15: NQO1 aktivitesi. ....	60
3.16: GST-CDNB aktivitesi. ....	62
3.17: GST-DCNB aktivitesi. ....	64
3.18: GST-EA aktivitesi. ....	66
3.19: Katalaz aktivitesi. ....	68
3.20: GPX aktivitesi. ....	70
3.21: SOD aktivitesi. ....	72
3.22: AST-ALT aktivitesi. ....	73
3.23: 30 mg/kg ellajik asitin sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzim aktiviteleri, mRNA ve protein düzeyleri üzerine kontrole oranla yüzde değişim oranları. ....	74
3.24: Ellajik asitin insan embriyonik böbrek 293 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	81
3.25: Ellajik asitin insan fibroblastik 3T3 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	82
3.26: Ellajik asitin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	83
3.27: Ellajik asitin insan akciğer kanseri PC-14 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	84

<b>3.28:</b> Ellajik asitin değişik hücre hatlarında P-53 ve PTEN genleri üzerine etkilerinin analizleri .....	86
--	----

## ŞEKİL LİSTESİ

### Şekiller

1.1: Çok evreli bir süreç olan karsinojenezin fitokimyasallarca bloke edilmesi veya baskılanması [39].....	4
1.2: Ellajitanenin hidrolizasyonu [99]. .....	10
1.3: Ellajik asidin kimyasal yapısı [101]. .....	11
2.1: Anilin 4-hidroksilasyonu.....	18
2.2: N-nitrosodimetilamin N-demetilasyonu. ....	18
2.3: Kafein N-demetilasyonu. ....	18
2.4: Eritromisin N-demetilasyonu. ....	19
2.5: Aminopiren N-demetilasyonu. ....	19
2.6: Etilmorfin N-demetilasyonu.....	19
2.8: Alkoksirezorufin dealkilasyonu.....	21
2.9: NQO1 enzimatik reaksiyonu .....	23
2.10: GPX enzimatik reaksiyonu.....	24
3.1: Denek bilgileri. ....	34
3.2: EROD aktivitesi.....	37
3.3: MROD aktivitesi.....	39
3.4: Kafein aktivitesi (C3ND). ....	41
3.5: Benzfetamin aktivitesi (BPND).....	43
3.6: Etilmorfin aktivitesi (EmND).....	45
3.7: BROD aktivitesi. ....	47
3.8: PROD aktivitesi.....	49
3.9: Aminopiren aktivitesi (APND).....	51
3.10: Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H). ....	53
3.11: NDMA aktivitesi. ....	55
3.12: Eritromisin aktivitesi (ErND).....	57
3.13: Aromataz aktivitesi (DBFOD). ....	59
3.14: NQO1 aktivitesi.....	61
3.15: GST-CDNB aktivitesi.....	63
3.16: GST-DCNB aktivitesi.....	65
3.17: GST-EA aktivitesi. ....	67
3.18: Katalaz aktivitesi. ....	69
3.19: GPX aktivitesi. ....	71
3.20: SOD aktivitesi. ....	73
3.21: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP1A üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve gerçek zamanlı PCR analizi.....	75
3.22: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2B üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve gerçek zamanlı PCR analizi.....	76
3.23: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2C8 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi. ....	77

<b>3.24:</b> Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2E1 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi. ....	78
<b>3.25:</b> Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP3A1 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi. ....	79
<b>3.26:</b> Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP19 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi. ....	80
<b>3.27:</b> Ellajik asitin insan embriyonik böbrek 293 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	81
<b>3.28:</b> Ellajik asitin insan fibroblastik 3T3 hücrelerine sitotoksik etkisi. ....	82
<b>3.29:</b> Ellajik asitin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisi. .	83
<b>3.30:</b> Ellajik asitin insan akciğer kanseri PC-14 hücrelerine sitotoksik etkisi ..	84
<b>3.31:</b> Ellajik asitin değişik hücre hatlarında P-53 ve PTEN genleri üzerine etkileri .....	85
<b>3. 32:</b> 30 mg/kg ellajik astin kanser metabolizması ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisi.....	92
<b>3.33:</b> İlaç ve steroid metabolizması üzerine 30 mg/kg ellajik asitin protein ekspresyon düzeyine etkisi.....	96
<b>3. 34:</b> İlaç ve steroid metabolizması üzerine 30 mg/kg ellajik asitin mRNA ekspresyon düzeyine etkisi.....	97

## ÖZET

### ELLAJİK ASİTİN KSENOBİYOTİK METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN VE İLAÇ-DİYET ETKİLEŞİM POTANSİYELİNİN MOLEKÜLER YAKALIŞMLAR İLE AYDINLATILMASI.

Bu çalışmada ellajik asitin ksenobiyotik metabolizması üzerine etkilerinin ve ilaç-diyet etkileşim potansiyelinin moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla sıçanlara iki farklı dozda ellajik asit enjekte edilmiş ve sıçan karaciğer mikrozomal 7-etoksirezorofin O-deetilaz (CYP1A1), aminopiren N-demetilaz (CYP2A, 2C), anilin 4-hidroksilaz (CYP2E1), dibenzoflorosein debenzilaz (CYP19-aromataz), eritromisin N-demetilaz (CYP3A1), etilmorfin N-demetilaz (CYP2B1), kafein N-demetilaz, (CYP1A2), N-nitrosodimetilamin N-demetilaz (CYP2E1) Metoksirezorofin O-demetilaz (CYP1A2) benziloksirezorofin o-dealkalaz (CYP2B9), pentoksirezorofin O-dealkalaz (CYP2B10), benzfetamin N-demetilaz (CYP2B), sitozolik glutatyon S-transferaz ve kinon reduktaz (NQO1) aktiviteleri tayin edilmiştir. Ellajik asitin etkilerinin moleküler düzeyde tanımlanması için aktiviteleri ölçülen enzimlerin gen ifade düzeyleri, RT-PCR yöntemi ile semikantitatif olarak saptanmıştır. Sıçan karaciğer mikrozomal ve sitozolik enzimlerin her birine özgü antikorlar kullanılarak Western blot tekniği ile her bir enzim izoformlarının protein düzeyleri immunolojik olarak tayin edilmiştir. Ellajik asitin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak ve var ise normal ve kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksikite farklarını belirlemek amacıyla hem kanser olmayan hücre dizileri (ebriyonik böbrek hücre dizisi 293 ve fibroblast hücre dizisi 3T3) hem de kanser hücreleri (meme kanseri hücre dizisi MCF7, akciğer kanseri hücre hattı PC-14) üzerine sitotoksik etki araştırılmıştır. Hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan ellajik asitin bu sitotoksik etkisini hangi mekanizmayı kullanarak gerçekleştirdiği sorusuna cevap aramak için PTEN ve p53'ün tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarına etkisi Western blot analizi ile araştırılmıştır. Ayrıca antioksidan enzimler (katalaz ve glutatyon peroksidaz), serum aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri ölçümleri ile ellajik asitin antioksidatif, oksidatif ve olası toksik etkileri saptanmıştır. 10 mg/kg ellajik asit uygulanan dozlarda CYP2B ve CYP2E enzim aktiviteleri azaldığı halde, diğer tüm aktivitelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca Western blot ve RT-PCR sonuçları ile bu enzim aktiviteleri uyum göstermiştir. Diğer yandan 30 mg/kg ellajik asit intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra NQO1, CAT, GPX, GSTs enzim aktiviteleri önemli derecede artarken CYP450 1A1, 2B1, 2B4, 2B9, 2B10, 2C6, 2E1 ve 19 enzim aktiviteleri önemli derecede azalmıştır. Buna ek olarak Western blot ve RT-PCR sonuçları anlamlı şekilde CYP2B, 2C6, 2E1 ve 19 protein ve mRNA seviyeleri azalmıştır fakat CYP1A mRNA ve protein seviyesi değişmemiştir. CYP3A enzim aktivitesi ve protein ve mRNA seviyesi ne 10 mg/kg ellajik asitte ne 30 mg/kg ellajik asitte

değişmemiştir. Sonuç olarak ellajik asitin ksenobiyotik metabolizmasında etken bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak ksenobiyotik metabolizmasını değiştirdiğini, antioksidatif, antimutajenik ve antikanserojenik etkiler gösterdiğini saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sitokrom P450, Ksenobiyotik Metabolizması, Ellajik Asit, Antitümör Etki

## SUMMARY

### COMPREHENSIVE IDENTIFICATION OF THE EFFECTS OF ELLAGIC ACID ON XENOBIOTIC METABOLISM AND ITS DRUG-DIET INTERACTION POTENTIALS USING MOLECULAR APPROACHES

The purpose of this project is to elucidate effects of ellagic acid on xenobiotic metabolism and its drug-diet interaction potentials using molecular approaches. For this purpose, ellagic acid was injected to rats in two different doses and then their hepatic microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1), aminopyrene N-demethylase (CYP2A, 2C), aniline 4-hydroxylase (CYP2E1), caffeine N-demethylase (CYP1A2), dibenzofluorescein demethylase (CYP19-aromatase), erythromycin N-demethylase (CYP3A1), ethylmorphine N-demethylase (CYP2E1), caffeine N-demethylase (CYP1A2), N-nitrosodimethylamine N-demethylase (CYP2E1), methoxyresorufin O-demethylation (CYP1A2), benzyloxyresorufin O-dealkylatase (CYP2B9), pentyloxyresorufin O-dealkylatase (CYP2B10), benzphetamine N-demethylase (CYP2B), cytosolic glutathione S-transferase (GST) and quinone reductase (NQO1) activities are going to be determined. In order to determine the molecular mechanism of actions of ellagic acid gene expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes given above was determined with the semi quantitative, RT-PCR. Expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes given above at the protein level was studied by Western blotting using specific antibodies against individual isoforms. Cytotoxic effects of ellagic acid on non cancer cell lines (293 and 3T3) and cancer cells lines (breast cancer cell line MCF-7 and lung cell lines PC-14) was compared. Tumor suppressor genes such as PTEN and p53 and was studied in those cell lines with Western blotting to clarify the underlying mechanism of cytotoxic actions observed with ellagic acid. In addition, effect of ellagic acid on antioxidant enzymes (catalase and glutathione peroxidase) and aspartate and alanine aminotransferases and was determined to study the oxidant, antioxidant possible toxic properties of extracts and pure constituents. Although the CYP2B and CYP2E enzyme activities were decreased, the activities of all other enzymes were not changed significantly with 10 mg/kg EA injection. In addition, Western-blot and qRT-PCR results clearly corroborated the above enzyme expressions. On the other hand, while the NQO1, CAT, GPX, GSTs enzyme activities were increased significantly, CYP450 1A1, 2B1, 2B4, 2B9, 2B10, 2C6, 2E1 and 19 enzyme activities were reduced significantly by an *i.p.* administration of 30 mg/kg ellagic acid. In addition, Western-blot and RT-PCR results markedly indicated that CYP2B, 2C6, 2E1 and 19 protein and mRNA levels were substantially decreased by 30 mg/kg dose of EA, but the CYP1A protein and mRNA levels were not changed. CYP3A enzyme activity, protein and mRNA levels

were not altered by neither 10 nor 30 mg/kg ellagic acid. As a result, ellagic acid altered xenobiotic metabolism by cause change in the expression of CYP450 enzymes which has an active role in the xenobiotic metabolism, it's reported that shown antioxidative, antimutagenic an anticancerogenic effects.

**Keywords:** Cytochrome P450, Xenobiotic Metabolism, Ellagic acid, Antitumour Effect



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda doğal olarak oluşan bitkisel kökenli kimyasallara (fitokimyasallar) gösterilen artan ilgi, bu kimyasalların kanser, yaşlanma ve kardiovasküler hastalıklar gibi patofizyolojik oluşumlarda önemli koruyucu rollere sahip olmalarının yapılan bilimsel çalışmalar ile gösterilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bitkilerin insan sağlığı üzerine olan etkileri şüphesiz asırlardır bilinmektedir. (Hipokrat İ.Ö. 5. yy'da 'Diyet Üzerine' tezinde hastalığın tedavisinde diyetin önemini tanımlamıştır) ve son birkaç yüz yılda alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların şifalı bitkilere olan ilgisi de, kuşkusuz diyetel gıdalar veya tıbbi bitkilerle alınan fitokimyasallar hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Avrupa ve Amerika'da birçok yerde bu fitokimyasallar ana kaynaklarından saflaştırılmış preparatlar halinde veya diyetel katkı olarak pazarlanmaktadır. Bu hazır bitkisel preparatların tüketimi Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa'da (örneğin İngiltere'de yaklaşık her dört erişkinden biri) çok hızlı bir artış göstermekte ve satışlar milyarlarca Euro'yu bulmaktadır [1-3].

Son on yıl süresince, bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasallar yüksek dozlarda ve sürekli alındıklarında; ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak ksenobiyotik metabolizmasını değiştirdiği, antioksidatif, antimutajenik ve antikanserojenik etkiler gösterdiğini bildiren kanıtlar sunulmuştur [4,5].

Bitkisel preparatlar eş zamanlı olarak bir veya birden fazla tıbbi ilaç alan hastalar tarafından da alınmakta ve aralarında hayati tehlike arz eden beklenmedik etkileşimler oluşabilmektedir [6-8]. Bu nedenle, bu ve benzeri preparatların ilaçlar dâhil ksenobiyotik metabolizması ile olan etkileşimlerinin bilimsel çalışmalar ile araştırılıp ortaya konması, antioksidatif, antimutajenik ve antikanserojenik etkilerinin saptanması son derece önem arz etmektedir.

## 1.1. Sitokrom P450 (CYP450) ve Fitokimyasal Etkileşimleri

Hem endojen (yağ asitleri, steroidler, Vitamin D vb) hem de ekzojen (ilaçlar, çevresel kirleticiler vb) bileşiklerin metabolizmasında rol alan sitokrom P450 (CYP450) enzimleri, sitokrom P450-bağımlı monooksijenazların [E.C.1.14.14.1] terminal enzimleridir ve Faz I enzimlerinin önemli bir ailesini teşkil ederler [9-21]. Enzime P450 adı indirgenmiş formunun karbon monoksit ile oluşturduğu kompleksin 450 nm’de maksimum absorpsiyon göstermesi nedeniyle verilmiştir. Günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık % 75’inin ve çok büyük miktarda diyetel kaynaklı bileşiklerin Faz I bağımlı metabolizmalarını Sitokrom P450 enzimleri gerçekleştirir.

Bu enzimler böbrek, akciğer, deri, bağırsak, adrenal korteks, plasenta gibi farklı dokularda bulunur, ancak özellikle karaciğerde çok etkindir. Prokaryotik enzim çözünür bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda iç mitokondriyal membranda ve endoplazmik retikulumda yerleşmiştir. Memeli sitokrom P450’leri; ilaçlar, karsinojenler, boyalar, organik çözücüler, pestisitler, alkoller, çevresel kirleticiler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında; steroid hormonların biyosentezinde; doymamış yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonunda ve yağda çözünen vitaminlerin metabolizmasında önemli rol oynarlar [22-28]. 20 Ağustos 2009 itibari ile toplam 11294 sitokrom P450 izozimi (3282 hayvan, 4266 bitki, 905 bakteri, 3570 fungus ve 1607 diğer ökaryotlar) tanımlanmıştır [29]. Bilhassa endoplazmik retikulumda bulunan P450 izozimlerinin substrat özgüllüğünün çok geniş olduğu, binlerce bileşiği metabolize ettiği gösterilmiştir [24,30]. Sitokrom P450’lerin çok fazla izoziminin bulunması ve birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir [31]. Bu sistemde her bir sitokrom P450 için belirli aileyi tanımlamak için rakamlar verilir. Bunu, alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler ve bir diğer rakam özgün P450 formunu göstermek için kullanılır. Örnek olarak 1A2 ve 2E1 verilebilir. CYP terimi ise sitokromun “cytochrome” ilk iki harfini ve P450’nin ilk harfini temsil eder [32-34].

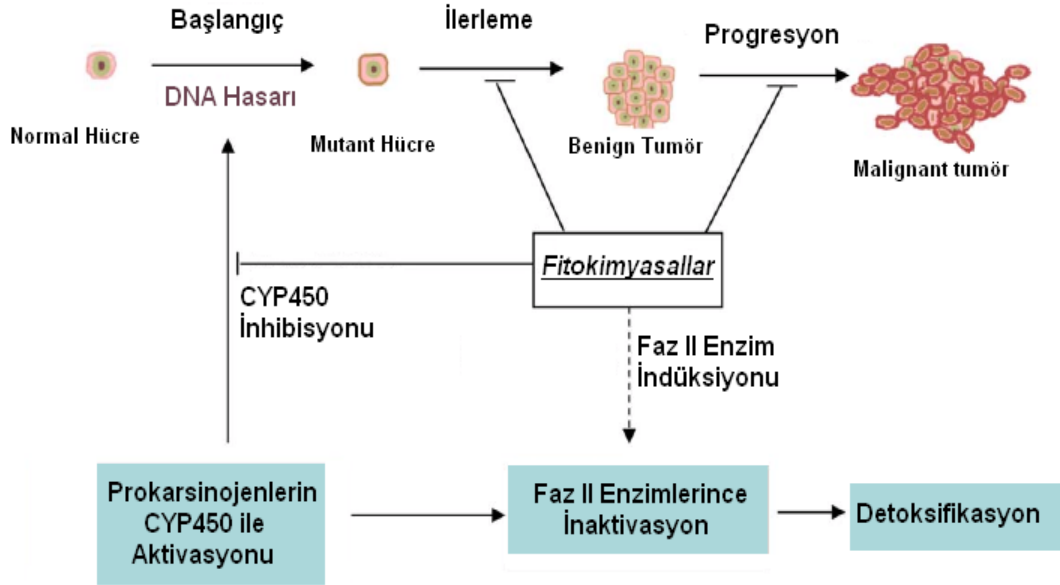
İnsanda bulunan 59 CYP450 izozimleri üç genel gruba ayrıştırılabilir.

- 1) Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3),
- 2) Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5-51) ve

3) Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi.

Bunlardan ilk grup (bu tez çalışma alanına giren gruptur) günümüzde kullanılan ilaçların Faz I bağımlı metabolizmalarının yaklaşık % 70-80'ini gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerini içerir [35]. Diyet, tür, genetik, yaş, fizyopatolojik şartlar ve çeşitli ajanlar sitokrom P450 enzimlerin aktivite ve ekspresyon düzeylerini etkilerler. Dokulardaki bazı sitokrom P450'lerin seviyeleri ve aktiviteleri organizmanın çeşitli kimyasallara maruz kalması neticesinde artma veya azalma gösterebilir. Dolayısı ile bu enzimlerin çeşitli bitkisel bileşiklerce düzenlenmesi, farmakolojik ve toksikolojik etkiye sahip birçok ksenobiyotiğin metabolizmasını etkileyerek çok önemli sonuçlar oluşturabilir.

Birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidlerin) özgün sitokrom P450 izozimlerini indükledikleri, aktivitelerini artırdıkları veya ketledikleri ve böylelikle ikincil uyartılara olan cevaplarını değiştirdiği bilinmektedir. Birçok karsinojenin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri CYP450 (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir [36-38]. Oluşan reaktif metabolitler diğer Faz I veya Faz II enzimlerince inaktif ürünlere dönüştürülmektedir. Sonuç olarak, karsinojenlerin bu şekilde detoksifikasyonunda rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ve/veya diğer Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyonu, karsinojenlerin etkilerine karşı bir koruma ve savunma sistemi oluşturabilir (Şekil 1.1). Ancak, oldukça çok sayıda karsinojenik kimyasal yine çok sayıda CYP enzimlerince hem aktif hem de inaktif metabolitlere metabolize edildiği için istenilen antikarsinojenik etkinin oluşumu, indükleyici ajanın hangi CYP450 izozimini ve hangi metabolik yolağı etkilediğine ve dolayısı ile indükleyici ajanın tanımlanmasına bağlıdır. Sonuçta, fitokimyasallar karsinojenlerin ve ilaçların etkinliğini, farmakolojik etkilerini ya azaltarak ya da artırarak etkileme potansiyeline sahiptir ancak istenilen etkinin sağlanması fitokimyasalın yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin tanımlanmasına bağlıdır.



Şekil 1.1: Çok evreli bir süreç olan karsinogenezin fitokimyasallarca bloke edilmesi veya baskılanması [39].

Sitokrom P4501 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 izoformlarının kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokarsinojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Akciğer kanseri [36] kolorektal kanser [40] ve meme kanseri [41] gibi karsinojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan birçok çalışmada diyetel veya diyetel olmayan bazı bitkilerden izole edilen bileşiklerin [(diyetel: galangin, theaflavin, quercetin, genistein vb) (diyetel olmayan: dimetoksiflavon, ksantohumol, diosmetin, hidroksichalchone, biochanin, dracaena cinnabari flavon vb.)] CYP1 izoformlarının ekspresyonlarını veya aktivitelerini inhibe etmeleri ile çeşitli kanser türlerinde önemli baskılayıcı etkiler gösterdikleri bildirilmiştir [42-48]. CYP2E1 etanol ile indüklenebilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilamin ve nitrozaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. CYP1 izoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak ta kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. CYP1 ailesinde olduğu gibi çeşitli fitokimyasalların CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek veya protein düzeyini azaltarak nitrozoaminlerin karsinojenik ve mutajenik etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir [49-51].

CYP2B fenobarbital gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan CYP izoformudur. Çeşitli bitki ve fotokimyasalların CYP2B aktivitesini indüklediği gösterilmiştir [52,53]. CYP2C ailesi ilaç ve kanser metabolizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bir kanser ilacı olan taksol'ün CYP2C8 tarafından kısmen metabolize edildiği bilinmektedir [54, 55]. CYP2C8 ayrıca endojen ajanlardan retinol'ün ve retinoik asit'in metabolizmasında yer almaktadır [56].

CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer aldığı için oldukça önemli bir CYP izoformudur. Çeşitli bitkilerin metanolik veya etanolik ekstresinin CYP3A4 aktivitesini modüle ettikleri ve bu bitki bileşenlerinin enzimle etkileştiği gösterilmiştir [4, 57, 58]. Dolayısı ile fitokimyasalların CYP3A4 tarafından metabolize edilen terapötik ajanların etkinliğini azaltarak ya da artırarak etkileme potansiyeline sahip olması ve çok sayıda bileşiğin metabolizmasında yer almasından dolayı bu etkileşimlerin tanımlanması son derece önemlidir. Genelde aromataz olarak bilinen ve östrojen biyosentezinde ve metabolizmasında hayati role sahip olan bir diğer CYP izoformu da CYP19'dur. Bu öneminin yanı sıra, artan CYP19 ifadesinin meme kanseri ile ilişkilendirilmiş olması nedeni ile de dikkat çekmiş ve üzerinde fazla araştırılma yapılmış CYP izoformlarından birisidir [59, 60]. Fitokimyasallar arasında özellikle flavonoidlerin ve isoflavonların östrojen yapısına benzemeleri nedeni ile aromatazın kompetitif inhibitörleri olarak etki göstermeleri meme kanseri için kimyasal koruyucu özellik kazanmalarını sağlamıştır [61].

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

Fitokimyasallar, Faz I enzimleri yanı sıra ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda yer alan diğer bir grup olan Faz II enzimlerini (genelde transferazlar) aktive ederek te antikarsinogenik etki göstermektedirler. Glutasyon S-transferazlar (GST'ler) [E.C.2.5.1.18] Faz II biyotransformasyon enzimlerinden çok fonksiyonlu ve dimerik olan bir ailedir, protein dizilerine, izoelektrik noktalarına, substrat spesifikliğine, inhibitörlere olan hassaslıklarına ve immünolojik özelliklerine dayanarak 8 sınıfta (alpha, mu, pi, theta, delta, kapa, omega ve zeta) toplanmışlardır [62, 63]. Çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik, hidrofobik bileşiklerin

glutasyon ile konjugasyonunu katalize ederler. Böylece GST'ler, dışarıdan alınan toksik yabancı maddelerin veya oksidatif basamakta oluşan ürünlerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre bileşkenlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar [64, 65]. Bu anlamda GST'ler, vücut için hayati koruyuculuk fonksiyonu üstlenmiş olan enzim gruplarından biridir. Örneğin, insan gastrointestinal mukoza hücrelerinde tümör oluşumunun GST ekspresyon düzeyleri ile negatif bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [66]. Bu nedenle, GST'lerin fitokimyasallarca modülasyonu kanser için bir kimyasal koruyucu mekanizma olarak önerilmektedir [67].

Kinon redüktaz (QR) veya NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1 (NQO1) (EC 1.6.99.2) kinon ve benzeri bileşiklerden kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruyan detoksifikasyon enzimlerindendir [68]. Kinon bileşikler oldukça reaktif bileşikler olup çeşitli enzimler tarafından bir elektron kopararak semikinon bileşiklerin oluşmasına neden olurlar. Oluşan bu bileşikler oksidatif stres, DNA hasarı, membran hasarı gibi sitotoksositeye neden olan reaktif oksijen türlerini oluştururlar [69]. Kinonlardan iki elektronun koparılması NQO'lar tarafından gerçekleştirilir ve bu reaksiyon neticesinde semikinon bileşikler ve bağlı reaktif oksijen türleri oluşturmadığından hücre, kinon ve kinon türevlerinin olası zararlarından korunmuş olur. Bu nedenle kanser çalışmalarında çoğunlukla çalışılan enzimlerdendir [70].

### **1.3. Antioksidan Enzimler ve Fitokimyasal Etkileşimleri**

Fitokimyasalların insan bedenini sürekli tehdit altında tutan oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalar sebze ve meyve tüketimi ile kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri, diyabet, Alzheimer hastalığı, katarak ve yaşla ilintili fonksiyonel kayıp riskinin azalması arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermekte, bu etkinin sebze ve meyvelerin içerdiği antioksidan etkinlik gösteren biyoaktif fitokimyasal bileşenlere bağlı olduğu belirtilmektedir. Vücudumuzda bizi serbest radikallere karşı koruyan çeşitli antioksidan enzimler vardır. Bunlar genel olarak katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz olarak sınıflandırılabilir.

Glutatyon peroksidaz, enzimin substrat olarak kullandığı molekül bir tiyol bileşiği olan redükte glutatyondur. Glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerini içeren bir tripeptittir. Serbest oksijen radikallerini direkt veya enzim aracılığıyla yakalar. Glutatyon hücrelerin çoğunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Hidrojen peroksit birikimi hemoglobinin met hemoglobine oksidasyon hızını artırır ve eritrosit ömrünü azaltabilir. Eğer canlıda yüksek miktarlarda peroksit açığa çıkarsa o zaman da katalaz enzimi devreye girer [71]. Katalaz, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktadır. Peroksidaz aktivitesine ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerinde oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir [72].

En aktif antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşik gruplarını oluşturur. Bitkilerdeki fenolik maddelere baktığımız zaman flavonoidler bu maddelerin yaklaşık üçte ikisini içeren dominant sınıf olarak karşımıza çıkmasına rağmen, son yıllarda küçük bir sınıf olan fenolik asitlerin antioksidan özellikleriyle ilişkili birçok çalışma dikkatleri bu grup üzerine çekmiştir. Bu maddelerin bitki odaklı yiyeceklerin yapısında kaçınılmaz olarak bulunduğundan dolayı, insanlar diyetlerine göre (diyetlerin sebze, meyve hububat, çay, kahve, baharat içeriğine göre) bu maddelerden günde yaklaşık 25 mg ile 1 g arasında almaktadırlar.

#### **1.4. Antikarsinojenik Etki ve Fitokimyasal Etkileşimleri**

Birçok bitkisel ajanın hücre içi sinyal yollarındaki hedef proteinlerin ekspresyonlarını etkileyerek tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkiyi çeşitli yollarla yapabilirler. Bunlardan biride tümör genlerini baskılamaktır.

Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler) ise kontrolsüz hücre proliferasyonu önlemede yer alırlar. Bu genlerde mutasyonlar sonucunda meydana gelen fonksiyon kaybı tümör gelişimine sebep olabilir. Bu genlerden başlıcaları: Retinoblastoma (Rb), p53, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2, Adenomatöz polipozis koli (APC), VHL, NF-1 ve NF-2 genleridir. PRb (Retinoblastoma protein) hücre siklusunda G1'den S fazına ilerlemesinde fren görevi yapan proteindir. Diğer önemli tümör baskılayıcı gen p53'tür. p53 geni 17. kromozom üzerinde bulunur. 11 eksondan oluşur. DNA hasarı sonrası ekspresyonu artar ve DNA tamiri tamamlanana

kadar hücrenin S fazına girmesini engeller. p53 tümör baskılayıcı gen, insan kanserlerinde en sık mutasyon gözlenen genlerden biridir [73].

## 1.5. Fitokimyasallar

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

Bitkisel materyallerde bulunan fitokimyasallar kabaca, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler bitkide serbest ve bağlı formda bulunurlar. Bağlı fenolikler ester, eter ve asetal bağları ile çeşitli bitkisel bileşiklere bağlanmış olabilirler [74]. Çok yaygın bulunanları; ellajik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bu aktif maddeler üzüm, çilek, ahududu, nar, portakal, patates, soğan, sarımsak, turp, soya, havuç gibi sebze ve meyvelerde, buğday, arpa, pirinç gibi hububatlarda, yer fıstığı gibi kuruyemişlerde, pekmez, bal, şarap, kahve ve çay da yüksek miktarda bulunduğundan, insanların diyetleriyle sıklıkla aldıkları bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadır [75-81].

Flavonoidler, fenolik ve piran halkalarından oluşan benzo- $\gamma$ -piron türevleridir ve substitüye gruplarına göre sınıflandırılırlar: flavonlar, flavanoller, flavononlar, isoflavonlar, isoflavanonlar, antosiyanidinler, kalkonlar, ve flavanonignazlar. Flavonoidler temel olarak antioksidan özelliklerinden ortaya çıkmış geniş alanda biyolojik aktivite sergileyen ve bazı enzim ve hücre reseptörlerini değişime uğratan bileşiklerdir. Bunlar antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antianjionik, analjezik, antiallerjik, karaciğer koruyucu, apoptotik, östrojenik, antiöstrojenik ve antikanserojenik özellikler içerirler [82, 83]. Bazı flavonoidlerin kimyasal yapısı ve aktiviteleri doğal olarak meydana gelmiş östrojene benzerdir ve bitkisel östrojenler olarak tanımlanırlar. Bununla birlikte bütün flavonoidler yararlı değildir. Bazı flavonoidler mutajenik veya pro-oksidan etkilere sahiptir ve aynı zamanda temel biyokimyasal yollara zarar verebilir [84].



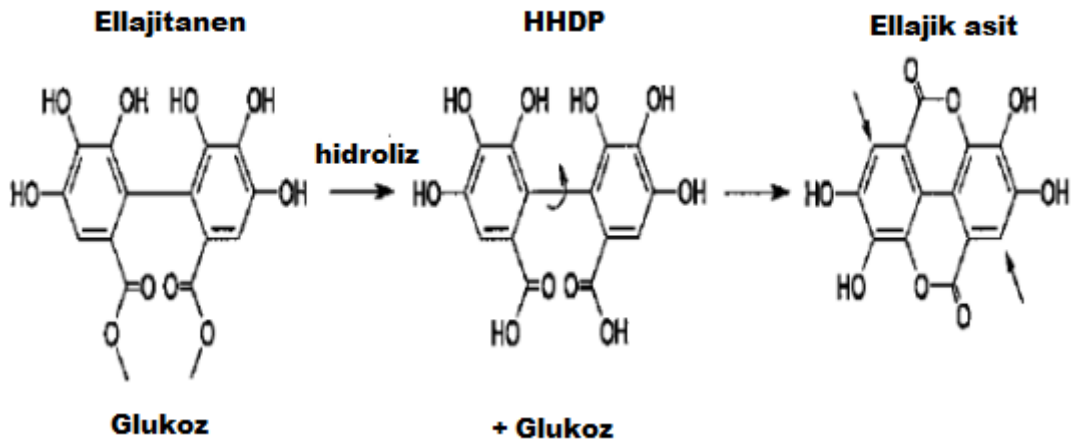
Bazı flavonoidler CYP450'lerin substratları olarak belirlenmiştir ve çeşitli CYP450'lerin indükleyicisi olarak rapor edilmiştir [85-88]. Galangin (3,5,7-trihidroksiflavon), kaempferol (3,5,7,4'- tetrahidroksiflavon), quercetine (3,5,7,3'4'-pentahidroksiflavon), genistein (5,7,4'-trihidroksiizoflavon), orobol (5,7,3',4'-tetrahidroksizoflavon), hesperetin (5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavanon) ve naringenin (5,7,4'-trihidroksiflavanon) en yaygın bilinen örnekleridir. Flavonoidler tarafından indüklenme mekanizması; bir spesifik reseptör aracılığıyla gen ekspresyonunun doğrudan uyarılmasını ve/veya CYP450 protein veya mRNA stabilizasyonu içerir [89]. Diğer bazı flavonoidler ise transkripsiyon faktörü olan Ah (Arihidrokarbon) reseptörüne bağlanarak CYP450'leri indüklerler [90]. Bu mekanizma CYP1 ailesi izozimlerinin (CYP1A1, 1A2 ve 1B1) aktivitelerinin yükselmesiyle ilişkilidir. Flavonoidler tarafından Ah reseptörünün kapatılmasıyla CYP1 ailesinin gen ekspresyonunun inhibisyonu flavonoidlerin kanseri önleyici özelliklerinde önemli bir rol oynar. Bir flavanol olan katekinler yeşil çayın temel polifenol bileşenleridir. Yeşil çay ve siyah çay; sıçanlarda immunoblot analizleri ile gösterildiği gibi CYP1A2'nin ekspresyonu ve metoksi- (CYP1A), etoksi-(CYP1A) ve pentoksi-(CYP2B) resorufinin O-dealkilasyonunu stimüle ederler [91]. Maliakal ve arkadaşları (2010) [92] dört hafta boyunca sıçanlara yeşil çay ekstresi verilmesinin CYP1A2 ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinde belirgin bir artış ile sonuçlandığını rapor etmiştir. Özet olarak flavonoidler; CYP450 izoformlarını, yapısal özelliklerine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak ya inhibe ya da aktive ederler.

## **1.6. Ellajik Asit**

Genelde, fenolik asitler bir karboksilik fonksiyon grubuna sahip olan fenollerdir. Bununla birlikte, ayrı ve belirgin organik asitleri fenolik asitler olarak adlandırılmakta, sinamik asit, benzoik asit ve aldehit analog olmak üzere farklı üç ayırt edici karbon iskelet yapısını içermektedir. Temel yapı aynı kalsa da, aromatik halkasındaki hidroksil gruplarının sayısı ve yeri değişerek farklılık oluşturmaktadır [93]. Fenolik asitler bütün bitkilerde bulunmaktadır. Özellikle, kafeik, p-kumarik, vanilik, ferulik ve protokatesik asitler gibi sinamik ve benzoik asitlerin türevleri, meyveler, sebzeler ve tahıllar gibi gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ellajik asit (4,4',5',5,6,6'-hekzahidroksi difenik asit 2,6,2',6'-dilakton) ise, gallik asidin

dimerizasyonu (ikizleşmesi) olup, bitkilerde, meyvelerde ve fındık ve ceviz gibi sert kabuklu yemişlerde, serbest halde veya diğer fenolik maddelerle bir arada bulunur [94].

Birçok araştırmacı çeşitli koyu renkli meyvelerin ellajik asit içeriği hakkında hidrolitik koşullarda şeker ve bazı fenolik asitlere indirgenebilen kompleks fenollere, hidrolize olabilen tanenler adını vermektedir. Hidrolize olabilen tanenler, iki gruba ayrılmaktadır: gallotanenler ve ellajitanenler [95]. Ellajitanenler, bitki ikincil metabolitleri olarak adlandırılan tanenlerin bir alt grubu olarak düşünülmektedir [96]. Ellajitanenler, şeker (genellikle glukoz) ile esterleşmiş bir veya daha fazla heksahidroksidifenol grubunu içeren hidrolize olabilen konjugatlar olarak karakterize edilmektedir [97]. Ellajitanenler, yüksek moleküler ağırlığa sahip suda çözünebilen fenolik bileşiklerdir. Ayrıca proteinleri ve alkaloidleri çöktürme yeteneğine sahiptirler. Ellajitanenlerin asit veya bazlarla hidrolizasyonunda ester bağları hidrolize olmakta ve heksahidroksidifenik asit (HHDP) kendiliğinden suda az çözünen ellajik aside dönüşmektedir. Ellajik asit, Ellajitaninlerin hidrolizi sonucu açığa çıkar, 4 hidroksil grubu ve 2 lakton grubu içerir. Hidroksil grubu antioksidan aktiviteyi artırır ve hücreleri oksidatif hasardan korur [98]. Ellajitanenin hidrolizasyonu Şekil 1.2’de gösterilmiştir [99].

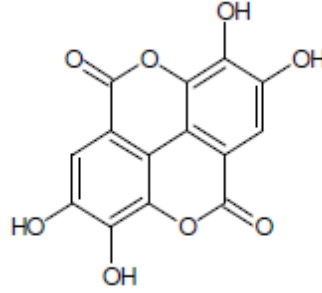


Şekil 1.2: Ellajitanenin hidrolizasyonu [99].

Bitkilerde ellajitanen monomerleri okside olabilmekte ve moleküler ağırlığı 4000’e ulaşan tetramerler, trimerler ve dimerler oluşturabilmektedir. Ellajitaninlerin hidrolizi sonucu ortaya çıkan plazma ellajik asit, 2 ortodihidroksil grubu içerir ve Katekol-O-Metil Transferaz (COMT) aktivitesi aracılığı ile dimetilellajik aside

transforme olabilir [100]. Dimetilellajik Asit daha sonra glukuronize olarak dimetilellajikasit glukuronid'e (DMEAG) dönüşür.

Ellajik asit, doğada birçok bitkide serbest ve ellajitanen glikozitleri halinde bulunan polifenolik bir bileşiktir. Ellajik asit 338,2 kDa moleküler ağırlığı ile heksahidroksidifenik asidin dilaktonudur [101]. Ellajik asit, doğada zayıf bir asit olup, 360°C üzerindeki yüksek erime noktası ile çok kararlı bir bileşiktir [102]. Ellajik asit, hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grupları (sırasıyla hidrojen bağ vericisi ve alıcısı olarak rol oynayabilir) ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ellajik asit ısıya oldukça dayanıklıdır [101]. Dört fenolik grup, ellajik aside kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonları ile kompleks form oluşturmasını sağlamaktadır [103]. Ellajik asit; suda az çözündüğü halde [101] metanolde, etanolde ve dimetil sülfoksitte iyi çözünmektedir [104]. Şekil 1.3'te ellajik asidin kimyasal yapısı gösterilmiştir [101].



Şekil 1.3. Ellajik asidin kimyasal yapısı [101].

Saf ellajik asitin biyoyararlanımı ellajitaninlerle karşılaştırıldığında düşüktür. Ellajik asitin zayıf emilimi suda az çözünmesi, fizyolojik pH'da bağırsakta Ca ve Mg ile iyonize olarak daha az çözünen bileşiklere dönüşmesi ve aynı zamanda intestinal epitele bağlanma kapasitesi ile ilişkilidir. Ellajik asitin intestinal mikroflora tarafından biyotransformasyonu sonucu EA'nın üriner metabolitleri olan 'Ürolitinler' ortaya çıkar. Absorbsiyonu takiben EA ve ürolitinler konjugasyona uğrar. İdrarda ve plazmada metil, glukuronil ve sülfat grupları ile konjuge formları bulunur [105].

Ellajik asit türevlerinin ve ellajitanenlerin biyoyararlanımı hakkında çok az şey bilinmektedir [106]. Barsak mikroflorasının, suda az çözünen ellajik asidi metabolize ettiği ileri sürülmektedir. Ellajitanenin daha fazla çözünür olması

nedeniyle, ellajitanenlerin absorpsiyonu veya türevlerine dönüşümü kolay olmaktadır ve barsaklarda bulunan enzimler ellajitanenlerin hidrolizasyonunu sağlayarak ellajik asit birimlerinin oluşmasına neden olmaktadır [107].

Ellajik asit insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı önemli biyoaktif bileşenlerden biridir. Ellajik asidin antioksidan, antikanserojenik, antiöstrojenik ve antimutajenik etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir [108-115]. Priyadarsini ve ark. [116] tarafından ellajik asidin serbest radikalleri sönmüldürerek, oksidatif hasarlara ve bunların neden olduğu bazı kanser tipleri gibi hastalıklara karşı organizmayı koruduğu belirtilmektedir. Ayrıca ellajik asit lipid peroksidasyonunda E vitamininden daha fazla antioksidan etki göstermektedir. Aynı araştırmacılar ellajik asidin suda çözünürlüğünün sınırlı olması, metanol ve dimetil sülfoksit gibi organik çözücülerde daha iyi çözünmesinden dolayı iyi bir lipofilik antioksidan gibi rol oynayabileceğini açıklamaktadırlar.

20. Yüzyılın başından beri geniş ölçüde kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve propil gallat gibi sentetik antioksidanların kanserojenik etkilerinden dolayı son zamanlarda gıdalara uygulanmalarına sınırlamalar getirilmektedir. Bu nedenle, ellajik asit gibi doğal antioksidanlara olan ilginin giderek artacağı da düşünülmektedir [117].

### **1.7. Çalışmanın Amacı**

Günümüzde birçok insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin en aza indirilmesi ve çeşitli hastalık etmenlerine karşı koruyucu ajanlar olarak bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasalları sıklıkla tüketmektedirler. Bu yüzden, son yıllarda fitokimyasalların anti-kanserojenik, anti-oksidatif ve anti-mutajenik etkiler gösterdiğini, karsinojenlerin metabolizmasında etken bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak bu tür maddelerin metabolizmasını değiştirdiğini bildiren birçok bilimsel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu fitokimyasalların çeşitli hastalıklardaki koruyucu ya da iyileştirici rollerinin veya zararlı etkilerinin tanımlanmasına yönelik bilimsel araştırmalar artan bir ilgi ile devam etmektedir.

Bu nedenle bu çalışmada diyetle sıklıkla alınan nar, çilek, ahududu gibi gıdalarda bulunan ellajik asitin, anti-karsinojenik etkilerinin ve etki mekanizmalarının saptanması amaçlanmıştır.

Pek çok doğal kaynaklı ürün, ksenobiyotiklerin (ilaç, çevresel kirleticiler) metabolizmasında rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak, ilaçlarla eş zamanlı olarak alınan doğal kaynaklı preparatlar, ilaç metabolizmasını etkilemekte, hayati tehlike arz edebilecek beklenmedik farmakolojik etkilerin- düşük ya da yüksek ilaç cevabı, ilaç toksisitesi, advers ilaç etkileşimleri gibi- oluşmasına neden olabilmektedir. Benzer olarak günlük hayatta maruz kalınan kimyasallarında (sigara dumanında, kirli şehir havasında, kişisel bakım ve diyet ürünleri vb.de bulunan) metabolizmasını değiştirerek önemli toksikolojik sonuçların doğmasına da neden olabilmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında, diyetle alınan besinlerde ve geleneksel tedavide kullanılan bitkilerde bulunan ellajik asitin, ksenobiyotik metabolizması ile olan etkileşimlerinin bilimsel çalışmalar ile araştırılıp ortaya konması son derece önemlidir. Bu çalışmada, ellajik asitin, birçok ilacın ve endojen maddenin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 izozimlerine olan etkileri belirlenecektir. Böylece bu aktif maddenin olası ilaç-ilaç, ilaç -diyet, ilaç-kimyasal etkileşimleri belirlenecek ve daha güvenli kullanımı için halk sağlığı açısından önemli veriler elde edilecektir.

## **2. MATERYAL ve METOT**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

Deneysel çalışmalarımız sırasında; Black Decker, V2600 homojenizatör, Sigma 3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (12156 rotor, PO Box 1713, D-37507, Germany), Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England), Shimadzu UV-1600A spektrofotometre, Metler Toledo MP 220 pH metre, Nüve ST 402 su banyosu, Vortex mixer VM-20, Hirayama Hiclave HVE-50 otoklav, Scaltec analitik terazi, Nuair -85 °C Ultralow Freezer, Human Power Scholar-UV saf su sistemi ve Electro-mag M 420P pastör kullanılmıştır.

#### **2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar**

Ellajik asit Alfa Aesar firmasından elde edilmiştir. Sığır serum albumin (BSA; A-7906), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB; 06298), etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (EDTA; 4931), 7-etoksirezorufin (E-3763), folin reaktifi (F-9252), glutasyon indirgenmiş formu (GSH; G-6013), p-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( $\beta$ -NADPH; N-7505), fenilmetan sülfonil florid (PMSF; P-7626), HEPES (H-3375), rezorufin pentil eter (P-2456), 7-benziloksi rezorufin (B-1532), N-nitrosodimetilamin (N-7756), anilin (A-9880), 4-metilamino antipiren (D-8015), eritromisin (E-6376), glukoz 6-fosfat (49280), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G-7877), sodyum potasyum tartarat (S-2377), polioksietilen-sarbiton-monolaurat (Tween 20; P-1379), N,N',N'-Tetrametil-etilen-diamin (TEMED; T-8133), Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)'dan elde edilmiştir. Bakır sülfat pentahidrat (61240), gliserol (15524), potasyum klorür (60129), sodyum karbonat (31432), asetil aseton (00909), p-amino fenol (1009), magnezyum klorür penta hidrat (63072), sodyum klorür (13423), Tris (33742), Fluka (GmbH Industrie Strasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'dan elde edilmiştir. Potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873),

hidroklorik asit (00314) Merck (Darmstadt, Germany)'ten elde edilmiştir. Etanol (32221), formaldehit (15512) ve fenol (16017) Riedel firmasından elde edilmiştir.

### **2.1.3. Dokuların Temini**

Bu çalışmada kullanılan Wistar Albino sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden temin edilmiştir. Dört aylık erkek sıçanlar (vücut ağırlıkları ölçülmüştür) gruplara ayrılmış ve tanımlanan uygulamalar belirlenen plan dâhilinde gerçekleşmiştir. Dokular (karaciğer) ve kan diseksiyon sırasında temin edilmiştir. Dokular ilk olarak buz üstüne alınmış ve önce soğuk distile su, daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırılmıştır. Dokular önce steril buzdolabı poşetlerine konmuştur ve daha sonrada alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek sıvı azotta dondurulmuştur. Ardından PAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırılmıştır, kanlar ise 10.000 rpm 10 dakika 4°C'de santrifüj edilerek serumları elde edilmiştir ve serumlar -20°C derin dondurucuya kaldırılarak muhafaza edilmiştir.

## **2.2. Metotlar**

### **2.2.1. Enjeksiyon Aşaması- *in vivo* Hayvan Çalışmaları**

Ellajik asit her biri en az on sıçandan (rat) oluşan gruplara intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

**Grup I (Kontrol I):** Bu grupta 10 adet sıçana ellajik asit ekstresinin verildiği eş hacimde dimetilsülfoksit verilmiştir. Böylelikle enjeksiyon uygulanacak deneklerde oluşacak stresin bu kontrol grubunda da oluşturulması sağlanmış, 5.gün giyotin kullanılarak dekapite edilerek ötenazi yapılmıştır.

**Grup II (Ellajik asit I):** Bu grupta 10 adet sıçan kullanılmıştır. Ellajik asit, % 0,1 dimetilsülfoksit ile çözülerek on gün boyunca 10 mg/kg vücut ağırlığı (va) olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresi ve dozu literatürde benzer çalışmalar için uygulanan doz ve süreler göz önüne alınarak saptanmıştır. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapitasyon ile ötenazi edilmiştir.

**Grup III (Ellajik asit II):** Bu grupta 10 adet sıçan kullanılmıştır. Ellajik asit, % 0,1 dimetilsülfoksit ile çözülerek on gün boyunca 30 mg/kg vücut ağırlığı (va) olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresi ve dozu literatürde benzer çalışmalar için uygulanan doz ve süreler göz önüne alınarak saptanmıştır. Son enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapitasyon ile ötenazi edilmiştir.

Tüm bu işlemler Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında Veteriner kontrolünde ve gözleminde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler için gerekli olan Etik Kurul izni Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulundan alınmıştır.

## **2.2.2. Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Saptanması**

### **2.2.2.1. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması**

#### **2.2.2.1.1. Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonların Eldesi**

Öncelikle elde edilen dokulardan Schenkman ve Cinti'nin (1978) [118] metodunun laboratuvar şartlarımız için optimize edilmiş olan Sen ve Kirikbakan (2004) [119] prosedürü ile S1.5, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlar hazırlanmıştır. Laboratuarda daha önceden ağırlıkları tartılan etiketli alüminyum folyolara sarılı dokular -80°C Nuaire (Nuaire Ultralow Freezer NU-6382E) derin dondurucudan çıkartılarak hemen buz üzerine alınmıştır. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Makas ile dokular buz üzerinde küçük parçalara ayrılmıştır. Kesilen dokulara, 3 mM EDTA pH 7,8; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM PMSF; 0,3 mM  $\epsilon$ -ACA; 0,15 mM BHT; %10 gliserol ve %0,15 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi eklenerek buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem cam-teflon homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Homojenizatör tüpüne alınan doku ağırlıklarının 3 katı homojenizasyon çözeltisi eklenmiştir. Homojenizasyon işlemi teflon tokmak cam tüp içinde 10 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek gerçekleştirilmiştir. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen homojenat, hücresel kalıntıları uzaklaştırmak üzere Sigma 3K soğutmalı santrifüj kullanılarak 700 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve



süpernatant çift katlı steril sargı bezinden süzülerek peletten ayrıştırıldıktan sonra 12000 xg de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen fraksiyonda pelet atılmış ve süpernatant ise hacminin 0,5 katı soğuk 0,16 M CaCl<sub>2</sub> eklenmesi ile 12000 xg de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı sitozol kısmı eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak etiketlenmiştir ve -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Kalan mikrozomal pelet, soğuk homojenizasyon çözeltisi ile yıkanarak 32000 xg de 20 dakika tekrar santrifüj edilerek yıkanmıştır. Çıkan süpernatant dökülerek pelete başlangıç doku ağırlığının 0,5 katı soğuk süspansiyon tamponu (2 mM EDTA pH 7,5; %10 gliserin) eklenerek elle homojenize edilip eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 °C Nuãire derin dondurucuda saklanmıştır.

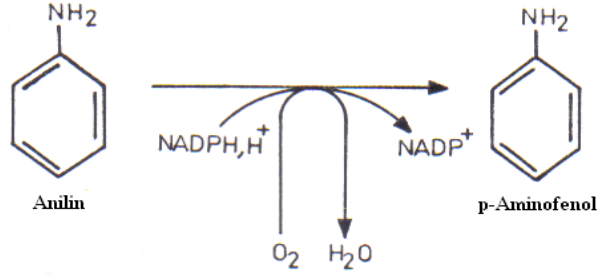
#### **2.2.2.1.2. Protein Tayini**

Dokulardan elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albumin) standart olarak kullanılarak Lowry ve ark. (1951)'nin [120] metoduyla yapılmıştır. 1:200 oranında seyreltilmiş olan mikrozomlar test tüplerine 0,1 ml'den 0,5 ml'ye değişen hacimlerde alınmış ve son hacim deiyonize distile su ile 0,5 ml'ye tamamlanmıştır. Sonra %2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve %2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in karıştırılmasıyla oluşturulan alkali bakır reaktifi ile karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden her bir tüpe ilave edilmiş ve 50 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçülmüştür. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplanmıştır.

#### **2.2.2.1.3. Anilin 4-Hidroksilaz (A4H) Tayini (CYP2E1)**

Doku mikrozomlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark. (1966) [121] tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir (Şekil 2.1). Tipik reaksiyon karışımı 100 mM HEPES tamponu, pH 7,6 ve 10 mM anilin, karaciğer için 1 mg mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH içerir ve son hacim 0,5 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 0,5 mM NADPH eklenmesiyle başlatılmış ve içinde mikrozomların yer aldığı sıfıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH ekmeden önce %20 TCA eklenmiştir. İnkübasyon 37°C'de, 25 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine %20 TCA

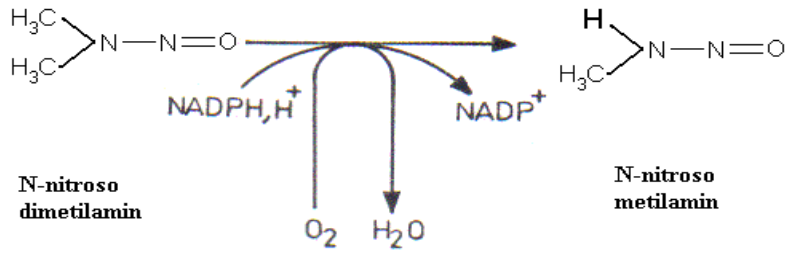
eklenmesiyle sona erdirilmiştir. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12100 xg de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sonuçta, süpernatant yeni tüplere transfer edilip %20 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek nötrale edildikten sonra 0,4 N NaOH içeren %20 fenol eklenerek renk oluşumu sağlanmıştır. Renk oluşumu için 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 630 nm’de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçülmüştür.



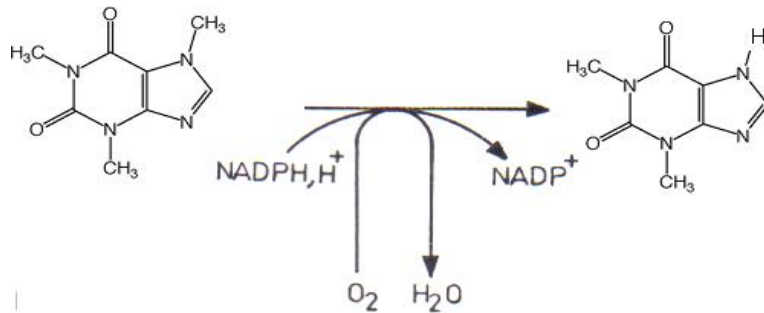
Şekil 2.1: Anilin 4-hidroksilasyonu.

#### 2.2.2.1.4. N-Demetilaz Aktivite Tayinleri

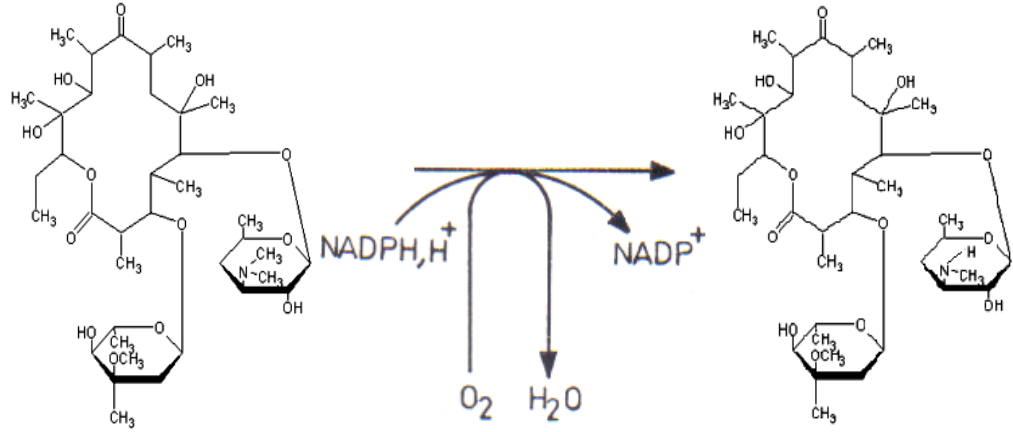
Sıçan doku mikrozomlarındaki eritromisin, kafein ve aminopiren N-demetilaz aktiviteleri Cochin ve Axelrod (1959) [122] tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) [123] metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. (Şekil 2.2-2.6).



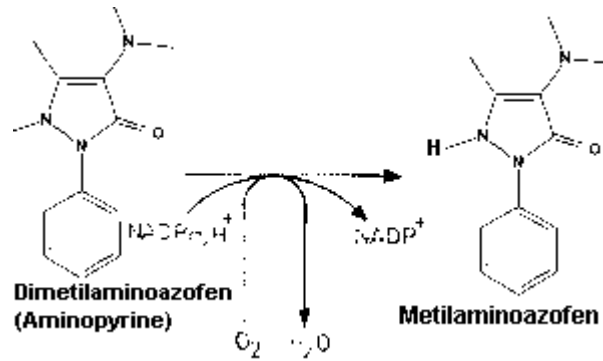
Şekil 2.2: N-nitrosodimetilamin N-demetilasyonu.



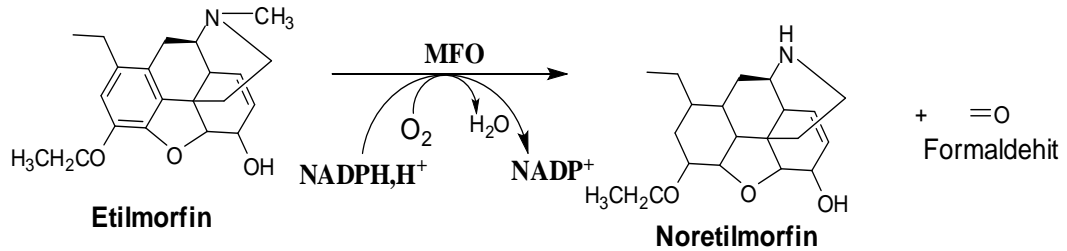
Şekil 2.3: Kafein N-demetilasyonu.



Şekil 2.4: Eritromisin N-demetilasyonu.



Şekil 2.5: Aminopiren N-demetilasyonu.



Şekil 2.6: Etilmorfin N-demetilasyonu.

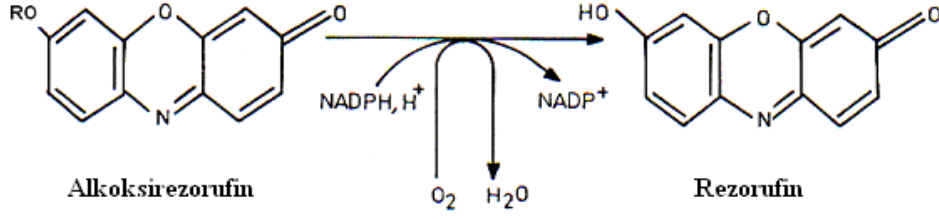
Tablo 2.1’de her bir substrat için reaksiyon karışımında olması gereken son konsantrasyonlar verilmiştir. Buna göre tipik reaksiyon karışımı HEPES tamponu, uygun substrat, belirtilen miktarlarda mikrozomal protein ve 0,5 mM NADPH ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. NADPH’ın ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırcıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH ekleden önce 0,75 N’lik perklorik asit eklenmiştir. İnkübasyon 37°C’de, 25 dakika çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon

tüplerine 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle sona erdirilmiştir. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 xg'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sonuçta, süpernatant yeni tüplere transfer edilip Nash reaktifinden eklenerek renk oluşumu için 10 dakika 50 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçülmüştür. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri sırasıyla, Etilmorfin N-Demetilaz (EmND; CYP2B) Eritromisin N-demetilaz (ErND), N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA-ND; CYP2E1), Kafein N-Demetilaz (CN3D; CYP1A2, CYP3A1) ve Aminopiren N-demetilaz (APND, CYP2C9, CYP3A, CYP2B) olarak isimlendirilmiştir. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar yukarıdaki şekillerde verilmiştir.

Tablo 2.1: N-demetilaz aktivite tayinleri için inkübasyon karışımının bileşenleri.

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

#### 2.2.2.1.4. Etoksirezorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktiviteleri Tayini



Şekil 2.7: Alkoksirezorufin dealkilasyonu.

Sıçan doku mikrozomlarının EROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) [124] metodu ile tespit edilmiştir ayrıca Arınç ve Şen (1994) [125] tarafından optimize edilen şartlar kullanılmıştır. Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksirezorufin (CYP1A1) kullanılmıştır. Tablo 2.2’de substrat için reaksiyon karışımında olması gereken son konsantrasyonlar verilmiştir. Buna göre tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7,80, 100 mM NaCl, 1,2 mg BSA, 100 µg mikrozomal protein verilen konsantrasyonlarda substrat ve 0,1 M NADPH içermektedir.

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

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.2’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatılmış ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre’de 2 dakika boyunca takip edilmiştir. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklenmiş ve floresans’taki artış kaydedilmiştir. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 2.7).

Tablo 2.2: EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH 7,8	100 mM
NaCl	100 mM
BSA	1,2 mg
Mikrozomal protein 1 mg/ml	100-200 µg
<u>Substrat</u>	
7-Etoksirezorufin	1,5 µM
NADPH	0,50 mM

#### 2.2.2.1.5. Sitolik Glutasyon S-Transferaz Aktivite Tayini

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), etakrinik asit (EA) substratları kullanılarak Habig ve ark. (1974) [126] tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Sen ve Kirikbakan'ın (2004) [127] optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir.

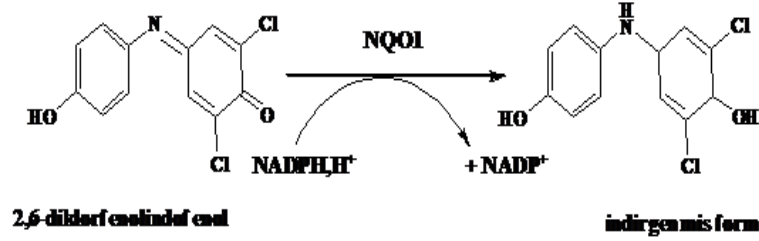
Tablo 2.3' deki gibi tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7,50, 1 mM redükte glutasyon (GSH), 25-50 µg sitozolik protein ve 1 mM CDNB, DCNB ya da EA içermektedir. Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.4'de belirtilen stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon en son CDNB ilave edilerek başlatılmış ve reaksiyon 10 sn'lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Jenway Specord 200 spektrofotometrede 340 nm'de 1 dakika boyunca takip edilmiştir. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.3: Tipik GST-CDNB, GST-DCNB, GST-EA aktiviteleri ölçüm karışımının içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH 7,5	100 mM
Glutasyon (GSH)	1 mM
CDNB, DCNB, EA	1 mM
Sitolik protein	50-100 µg

### 2.2.2.1.6. Sitozolik Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivite Tayini

Hazırlanan doku sitozollerinde NQO1 aktivitesi 2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP) substratı kullanılarak Ernster ve ark. (1960) [128] tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edilmiştir. Bu metot 600 nm’de ışığı absorplayan DCPIP ‘nin NQO1 tarafından indirgenmesi sonucu oluşan indirgenmiş formunun azalan absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: NQO1 enzimatik reaksiyonu

Tablo 2.4’deki gibi tipik reaksiyon ortamı 25 mM potasyum fosfat (KPi) tamponu pH 7.8, 0.7 mg/ml Sığır Serum Albümini, 0.2 mM NADPH, 40 mM 2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP) ve 50-100 µg sitozolik protein içermektedir. Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.4’de belirtilen stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon en son NADPH ilave edilerek başlatılmıştır ve reaksiyon 10 sn’lik bir bekleme süresinden sonra absorbans değişimi spektrofotometrede 600 nm’de 2 dakika boyunca takip edilmiştir. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve 21 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> olan molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.4: Tipik NQO1-DCPIP aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok Çözeltiler	SonKonsantrasyon
KPi tamponu pH 7.8	25 mM
Sığır Serum Albümini	0.7 mg/ml
Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	0.2 mM
2,6 diklorofenolindofenol (DCPIP)	40 mM
Sitozolik protein	50-100 µg

## 2.2.2.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

### 2.2.2.2.1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz enziminin aktivite ölçümü Abei (1974) [129] tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot katalaz tarafından hidrojen peroksitin oksidasyonununun 240 nm’de takibine dayanmaktadır.

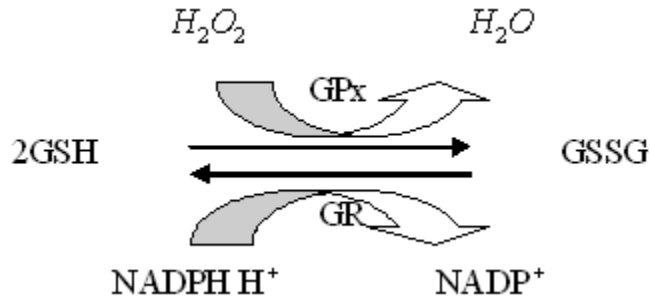
Tablo 2.5’te verildiği üzere reaksiyon ortamı hazırlanmıştır ve çözeltiler verilen sırada 3 ml’lik kuartz küvetlere konularak Jenway Specord 200 spektrofotometrede 240 nm’de 5 dakika takip edilmiştir. Enzim aktiviteleri elde edilen dakikada absorbans değişimleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.5: Tipik bir katalaz aktivite ölçüm reaksiyonunun içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH 7.0	140 mM
Hidrojen peroksit	% 3
Enzim (1000xg post fraksiyonel protein)	0,2 mg

### 2.2.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Aktivite Tayini

GPx enziminin aktivite ölçümü Paglia ve Valentine (1967) [130] spektrofotometrik metodu kullanılarak tayin edilmiştir. Bu metot NADPH’in NADP<sup>+</sup> ye oksidasyonununun 340 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: GPX enzimatik reaksiyonu.



Tablo 2.6: Tipik bir glutatyon peroksidaz aktivite ölçümünün içeriği.

Stok çözelti	Son Konsantrasyon
Tris-HCl pH 7.2	0,075 mM
GSH	1 mM
EDTA	0,1 mM
NADPH	0,05 mM
Glutatyon redüktaz	0,24 U
Enzim (sitozolik protein)	1 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0075 mM

Çözeltiler Tablo 2.6'da verilen sıraya göre 3 ml'lik kuartz küvetlere konulmuştur. En son enzim koyulduktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. Daha sonrada 30 µl hidrojen peroksit reaksiyon ortamına eklenerek Jenway Specord 200 spektrofotometrede 340 nm'de 3 dakika boyunca takip edilmiştir. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri ve molar absorblama katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### 2.2.2.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

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

Çözeltiler Tablo 2.7'de verilen sıraya göre 3 ml'lik kuartz küvetlere konuldu ve Jenway Specord 200 spektrofotometrede 440 nm'de 7 dakika boyunca takip edildi. Daha sonra buradan elde edilen absorbanslara göre SOD aktivitesi hesaplandı. Her bir doku fraksiyonu için 50, 100, 200, 300, 400 µg protein ile bu işlem tekrarlandı. Protein miktarına göre aktivite değişimi dikkate alınarak hesaplamalar yapıldı.

Tablo 2.7: Tipik bir SOD aktivite ölçümünün içeriği.

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

### **2.2.2.3. Diagnostik (Sitotoksik) Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması**

#### **2.2.2.3.1. Serum Aminotransferazların (Aspartat ve Alanin)Tayini: (AST ve ALT)**

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) [131] metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edilmiştir. 0,2 ml serum 1 ml AST Substratı (alkali ortamda  $\alpha$ -ketoglutarat ve D-L-aspartik asit veya alanin) ile 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ortama renk reaktifi (alkali dinitrofenilhidrazin) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Son olarak reaksiyon tüplerine 0,4 N NaOH eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip oluşan renk 505 nm'de köre karşı okunmuştur. Standard eğriden elde edilen eğimin kullanılması ile enzim aktiviteleri hesaplanmıştır.

### **2.2.2.4 Ellajik Asitin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması**

#### **2.2.2.4.1. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi**

Mikrozomal proteinler Laemmli (1970)'de [132] belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir. Her bir CYP450 izozimi için spesifik antikorlar kullanılarak Western blot tekniği ile her bir enzimin protein düzeyleri immunolojik olarak tayin edilmiştir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.8'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

Tablo 2.8: SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

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

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Hoefer Cooled Dual Gel Electrophoresis System (Model SE600/SE660) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik ayrıştırma sistemi Consort EV265 güç kaynağına bağlanmıştır. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatılmıştır. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınıp ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 45 dakika süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavisi R 250, %50 metanol ve %12 glasiyal asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyanmış ve hem de sabitlenmiştir. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilmiştir (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jel fotoğraflanmış ve %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklanmıştır.

Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western blot analizi [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) [133, 134] tarafından tanımlandığı gibi] için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Elektroforetik transfer Panther Semidry Electroblotter Model HEP-3 kullanılarak Yarı-kuru transfer yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Panther Semidry Electroblotter'ın platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirilip ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlanmıştır. Whatman # 1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatlice yerleştirilmiştir. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 konarak sandviç tamamlanmıştır. Hava kabarcıklarının tamamen

uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlanmıştır ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulanmıştır. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirilmiştir ve sistemin vidaları sıkılmıştır. Elektroforetik transfer sistemi Thermo EC1000-90 model güç kaynağına bağlanmış ve voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 400 mA'e ayarlanmıştır ve 1 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Süre sonunda güç kaynağı kapatılmış ve sistemin vidaları açılmıştır. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'blot', elde edilmiştir. Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel yukarıda tanımlandığı gibi boyanmıştır. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirilmiştir. 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda blot önce bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikorlar ve daha sonra işaretleyici enzim-horseradish peroksidaz (anti-rabbit/anti-mouse IgG-HRP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edilmiştir. Daha sonra blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran fare antikorlarına karşı spesifik olarak keçi üzerinde geliştirilmiş, 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (goat anti-mouse sekonder antikor) bulunduran %5 kurusütlü TBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL çözeltisi kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatılmıştır ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlenmiştir.

#### **2.2.2.4.2. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi**

Ellajik asitin enzimlerin gen ifadeleri düzeylerine etkilerini saptamak için mRNA düzeyleri RT-PCR (Gerçek zamanlı PCR) yöntemi ile kantite edilmiştir. Bu amaçla, Total RNA izolasyonu Trizol solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dokular sıvı azotta öğütüldükten sonra yaklaşık 50 mg doku tartılıp, üzerlerine 500 µl Trizol solüsyonu eklenmiştir ve oda sıcaklığında düşük hızda karıştırılmıştır. Ardından 100 µl kloroform eklenerek 1dakika yüksek hızda karıştırılmıştır. Daha sonra, 5 dakika oda sıcaklığında ve 5 dakika buzda inkübe

edilip 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. RNA içeren supernatant yeni steril eppendorfa alınıp eşit hacimde soğuk saf isopranoöl eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra, tüpler 13.000 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine 1000 µl %75'lik soğuk etanol eklenip 7.500 rpm'de, 4°C'de 5 dakika santrifüj'den sonra RNA içeren pelet alev çatısı altında kurutulmuştur ve 75 µl RNAase içermeyen su içinde çözülerek -80°C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA kalitesi %1'lik agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlenmiştir. Elde edilen RNA'ların 260/280nm ölçümü ile miktarı belirlenmiştir. cDNA sentezi sırasında 5 µg RNA kullanılması sağlanmıştır.

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlenmiştir. cDNA sentezi için 5 µg toplam RNA ve 0,5 µg oligo (dT) primeri karıştırılmıştır ve son hacmi 11 µl RNAase içermeyen su ile tamamlanmıştır. Karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl, 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> ve 50 mM DDT) ve 2 µl dNTP karışımı eklenmiştir. 5 dakika, 37°C'de inkübasyondan sonra 50 ünite Moloney-Murine Leukemia Virus Revers Transkriptazı eklenerek son hacim 20 µl tamamlanmıştır. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 70°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, gerçek zamanlı PCR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ellajik asitin yukarıda belirtilen proteinlerin gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptanmıştır. Bu primerlerin nükleotid dizileri Tablo 2.9'da verilmektedir. Kantitatif Real Time PCR Corbett (QIAGEN) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon Maxima SYBR Green I (Fermentas) ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tüpüne 5 µl cDNA, 9 µl su, 2 µl gen spesifik primer, 4 µl FastStart Tag DNA polimeraz, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye ve dNTP mix içeren Master Mix eklenmiştir. İç standart gen olarak β-aktin kullanılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımı (tüpü) PCR işlemi için önce 94°C'de 15 dakika denatürasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon işlemi 95°C'de 10 saniye, 55-57°C'de 5 saniye, ve 72°C'de 15 saniye olmak üzere toplam 45 döngüden sonra, 49°C'de 30 saniye son uzatma ile

gerçekleştirilmiştir. Her bandın densitometrik analizi iç standart gen olan  $\beta$ -aktin densitometrik analizi ile karşılaştırılarak nasıl değiştiği belirlenmiştir.

Tablo 2.9: Seçilen CYP450 genleri için tanımlanan primer dizileri.

<b><u>Primer Adı*</u></b>	<b><u>Primer Dizisi(5'→3')</u></b>
CYP19A1F	GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG
CYP19A1R	CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG
CYP1A1F	ATGCCAATGTCCAGCTCTC
CYP1A1R	GGAACTCGTTTGGATCACC
CYP2B1F	TGGACAGAAGAGGTCTCCTCA
CYP2B1R	GAGCAGGTGCAGAACTGGT
CYP2C6F	CGGGAAGTCATACGACATTAGC
CYP2C6R	GCAGAGAGGCAAATCCATTG
CYP2E1F	GTCTGAGGCTCATGAGTTTG
CYP2E1R	TCTGGAAACTCATGGCTG
CYP3A1F	AATTCGATGTGGAGTGCCAT
CYP3A1R	CGGATAGGGCTGTATGAGATTC
BACTINF	TGCAGAAGGAGATTACTGCC
BACTINR	CGCAGCTCAGTAACAGTCC
* Primer adı CYP izoformunu tanımlamakta F(forward) R(reverse) primerleri simgelemektedir.	

#### **2.2.2.5. Ellajik Asitin Genotoksik Etkilerinin Saptanması**

Ellajik asitin kanser ve kanser olmayan hücre dizileri üzerindeki olası sitotoksik etkisini saptamak ve var ise bu hücreler üzerindeki sitotoksisite farklarını saptamak amacıyla hem kanser olmayan hücre dizileri (ebriyonik böbrek hücre dizisi 293 ve fibroblastik hücre dizisi 3T3) hem de kanser hücreleri (Akciğer kanseri hücre hattı PC14, meme kanseri hücre hattı MCF-7) sitotoksik etki araştırılmasında kullanılmıştır. Hücrelerin kültürasyonu aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

##### **2.2.2.5.1. Hücre Kültürü ve Ellajik Asitin Uygulanması**

Tüm hücre dizileri %10 FCS içeren RPMI1640 besi ortamı içerisinde 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir. Ellajik asit suda çözülür formda olmadığından %0,1 DMSO içeren besiyeri içinde çözülmüştür ve 0,2

mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra 6 farklı konsantrasyonda (0,025mg/ml, 0,05mg/ml, 0,025mg/ml, 0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,5mg/ml, 0,1mg/ml) hem kanser hücre dizileri üzerine hem de kanser olmayan hücre dizileri üzerine 48 saat süresince maruz bırakılmıştır. Ellajik asit uygulanmadan tüm hücreler  $1 \times 10^5$ /kuyu hücre olmak üzere 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve %10 FCS içeren RPMI1640 besi ortamında 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda ellajik asit değişik konsantrasyonlarda hücreler üzerine her konsantrasyondan 3 kontrollü olmak üzere uygulanmış ve 48 saat 37°C de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakılmışlardır.

Hücre canlılık testi yapmak için 48 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmıştır ve üzerine % 10 etanol içinde hazırlanmış kristal viyole boyası eklenmiştir. Süre sonunda boya hücrelerde yıkanarak uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine % 50 etanol içinde 0,1 M pH 4.2 sodyum sitrat çözeltisi her kuyuda 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. 15 dakika çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 660 nm’de spektrofotometrede (Thermo Microplate Reader) okunmuştur.

#### **2.2.2.5.2. Ellajik Asitin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisinin Western Blot ile Saptanması**

Hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan ellajik asitin bu sitotoksik etkisini hangi mekanizmayı kullanarak gerçekleştirdiği sorusuna cevap aramak için PTEN, p53 gibi tümör baskılayıcı gen ekspresyonları Western blot analizi ile araştırılmıştır. Öncelikle hücreler steril petrielerde büyütülmüştür. Daha sonra hücre üzerine sitotoksik etkisi saptanan dozlarda ellajik asit hücrelere steril olarak eklenmiştir. 48 saatin sonunda hücreler Ripa tamponu (0,5mM NaCl, 1M pH 7,6 Tris-HCl, 5 % deoksikolat, 1 tablet proteaz inhibitörü) ile toplanmıştır. Toplanan örneklerden farklı eppendorf tüplere alınmış ve örneklerin protein miktarları Lowry ve ark. (1951) yöntemi ile saptanmıştır. Daha sonra örnekler %10’luk SDS-PAJE jelle uygulanmış ve elektroforeze tabii tutulmuştur. Elektroforez işleminin ardından proteinler membran üzerine transfer edilmiştir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin fare kaynaklı primer antikolarla işaretlemesinin ardından, membran 1 saat PBST ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran fare antikolarına karşı spesifik olarak keçi üzerinde geliştirilmiş, 1:10000 oranında

HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (goat anti-mouse sekonder antikor) bulunduran %5 kurusütlü PBST çözeltili içinde tekrar işaretilenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL çözeltili kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatılmıştır ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlenmiştir.

#### **2.2.2.6. İstatiksel Analizler**

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



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Enjeksiyon Aşaması – *in vivo* Hayvan Çalışmaları

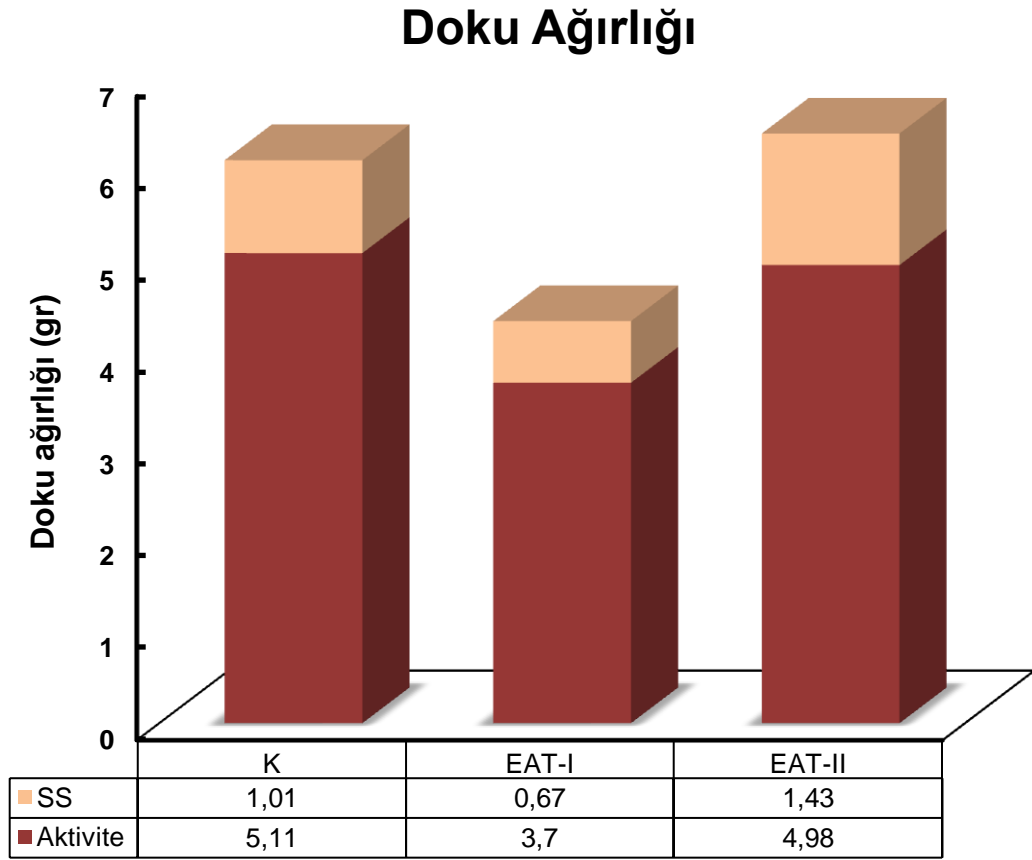
Enjeksiyon işleminde kullanılan deneklerle ilgili bilgiler aşağıdaki Tablo 3.1 ve Şekil 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Denek bilgileri.

Grup	Sıçan Sayısı	Sıçan Kodu	Vücut Ağırlığı (gr)		Doku Ağırlığı (gr)
			Deney Öncesi	Deney Sonrası	
Kontrol (K)	10	K1	205	198	4,25
		K2	212	201	4,13
		K3	229	226	5,48
		K4	202	208	4,16
		K5	215	202	4,65
		K6	242	235	5,14
		K7	287	280	7,20
		K8	269	258	6,05
		K9	252	235	4,93
		K10	272	211	4,32
10 mg/kg Ellajik Asit (EAT-I)	10	EAT1	252	244	4,62
		EAT2	225	222	4,06
		EAT3	244	231	4,72
		EAT4	206	206	3,38
		EAT5	194	187	3,13
		EAT6	193	184	3,22
		EAT7	195	188	2,85
		EAT8	198	190	3,28
		EAT9	206	203	3,45
		EAT10	195	187	4,16
30 mg/kg Ellajik Asit (EAT-II)	10	EAT11	180	173	3,17
		EAT12	187	178	2,55
		EAT13	273	265	5,25
		EAT14	277	270	5,15

	EAT15	307	300	5,70
	EAT16	292	283	5,92
	EAT17	250	249	7,13
	EAT18	262	256	6,38
	EAT19	244	236	4,37
	EAT20	232	229	4,23

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



Şekil 3.1: Denek bilgileri.

### 3.2. Fraksiyonların Protein Değerleri

Post mitokondriyel, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0-200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanılmıştır. Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerinden hazırlanan S1.5, sitozol ve mikrozom fraksiyonlarının protein miktarları Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2: Sıçan karaciğer fraksiyonlarının protein miktarları.

Sıçan Kodu	Protein Miktarı (mg/ml)		
	S1.5	Sitozol	Mikrozom
K1	58,12	32,26	21,38
K2	58,89	38,07	26,25
K3	46,00	32,82	18,92
K4	55,33	36,18	26,82
K5	52,00	39,62	22,76
K6	44,74	33,14	28,23
K7	54,05	37,75	30,22
K8	52,62	33,97	26,80
K9	47,79	35,55	27,60
K10	54,23	34,34	23,26
EAT1	58,45	35,93	21,34
EAT2	45,32	32,14	19,32
EAT3	53,21	32,98	18,98
EAT4	52,34	31,43	17,32
EAT5	55,78	25,77	13,64
EAT6	58,44	32,82	16,73
EAT7	59,56	36,22	18,36
EAT8	49,33	27,37	18,14
EAT9	49,78	31,61	17,25
EAT10	59,33	30,16	16,62
EAT11	64,67	29,64	25,59
EAT12	62,67	30,39	22,62
EAT13	43,78	28,38	16,14
EAT14	44,26	32,58	17,53
EAT15	41,67	30,25	15,63
EAT16	36,67	24,85	13,96
EAT17	45,29	33,20	14,73
EAT18	48,64	31,47	20,04
EAT19	42,83	31,27	18,38
EAT20	42,10	32,97	17,77

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

### 3.3. Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

Her bir enzim için Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğer enzim aktivite sonuçları aşağıda tek tek verilmektedir.

### 3.3.1. CYP1A Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

#### 3.3.1.1. EROD

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

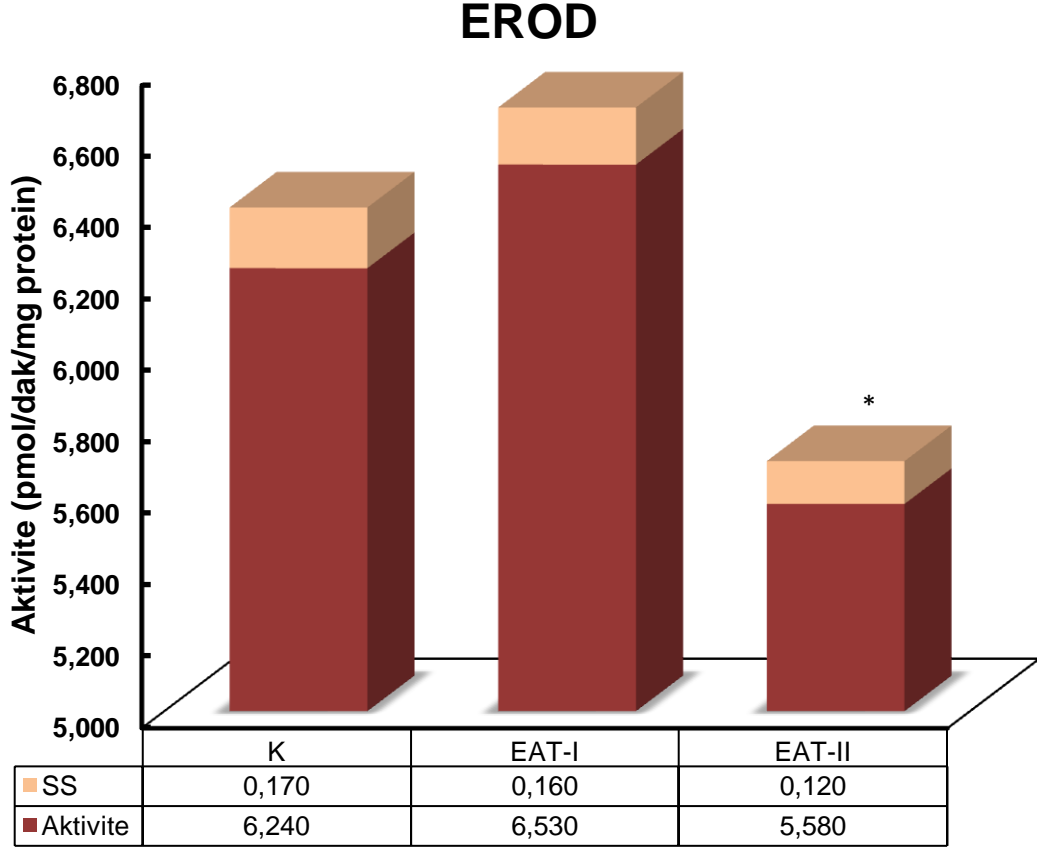
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.3 ve Şekil 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.3: EROD aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	3,77	0,09
K2	11,14	0,52
K3	3,95	0,68
K4	6,19	0,31
K5	5,16	0,69
K6	7,44	0,24
K7	7,23	0,43
K8	5,79	0,06
K9	6,23	0,47
K10	5,46	0,17
EAT1	1,76	0,18
EAT2	9,290	0,335
EAT3	6,510	0,017
EAT4	5,563	0,256
EAT5	8,467	0,107
EAT6	8,530	0,000
EAT7	6,635	0,078
EAT8	8,490	0,042
EAT9	4,125	0,247
EAT10	5,895	0,375
EAT11	4,43	0,22
EAT12	5,51	0,32
EAT13	6,05	0,45
EAT14	5,45	0,36
EAT15	5,14	0,44
EAT16	6,52	0,84
EAT17	5,12	0,41
EAT18	7,38	1,15

EAT19	4,07	0,80
EAT20	6,14	0,22

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



\*, Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 3.2: EROD aktivitesi.

### 3.3.1.2. MROD

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

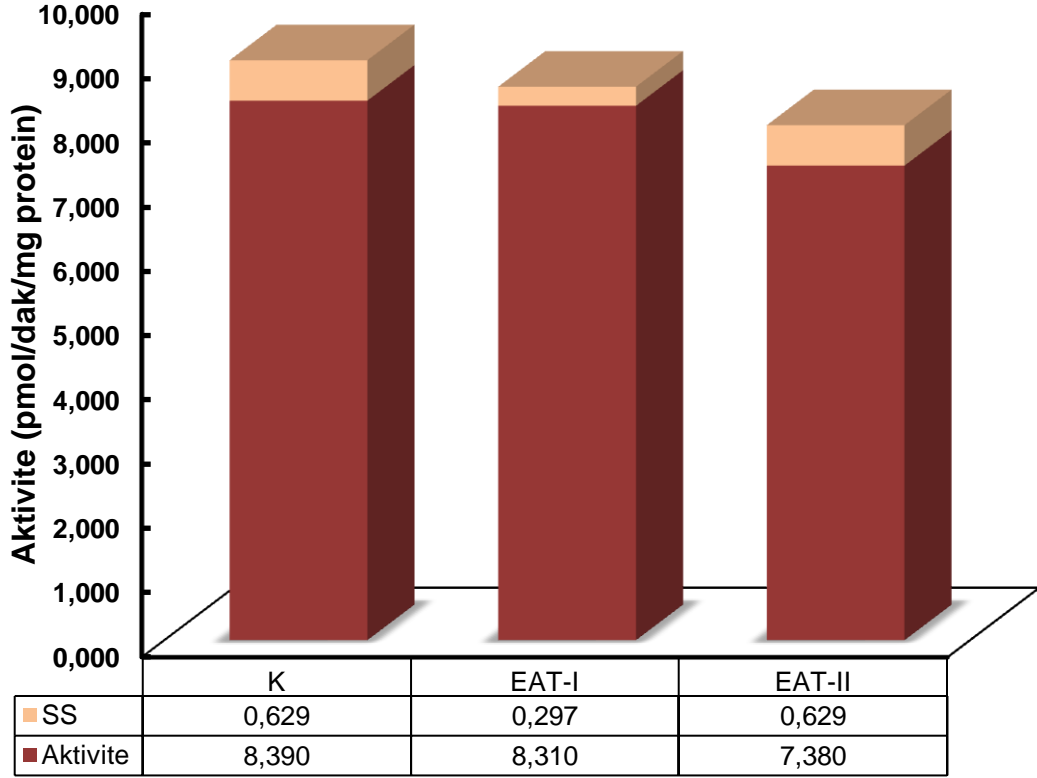
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.4 ve Şekil 3.3'de gösterilmektedir.

Tablo 3.4: MROD aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	8,385	0,012
K2	8,685	0,191
K3	7,187	1,347
K4	9,437	1,717
K5	7,847	0,808
K6	8,113	0,500
K7	9,025	0,870
K8	8,845	0,530
K9	8,695	0,035
K10	7,695	0,276
EAT1	8,260	0,212
EAT2	6,095	0,219
EAT3	7,170	0,212
EAT4	8,140	0,184
EAT5	9,435	0,290
EAT6	8,405	0,502
EAT7	9,130	0,438
EAT8	8,185	0,502
EAT9	9,975	0,403
EAT10	8,335	0,007
EAT11	8,025	0,742
EAT12	6,803	0,707
EAT13	6,415	0,346
EAT14	8,025	0,502
EAT15	7,600	1,075
EAT16	7,480	0,295
EAT17	7,837	0,583
EAT18	8,347	0,504
EAT19	6,415	0,658
EAT20	6,880	0,877

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

## MROD



Şekil 3.3: MROD aktivitesi.

### 3.3.1.3. Kafein (C3ND)

Sitokrom P4501A2 aktivitesi sıçan doku mikrozoamlarında kafein substratı kullanılarak çalışılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir. Doku mikrozoamlarındaki kafein aktivitesi, Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir.

Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.5 ve Şekil 3.4'de gösterilmektedir.

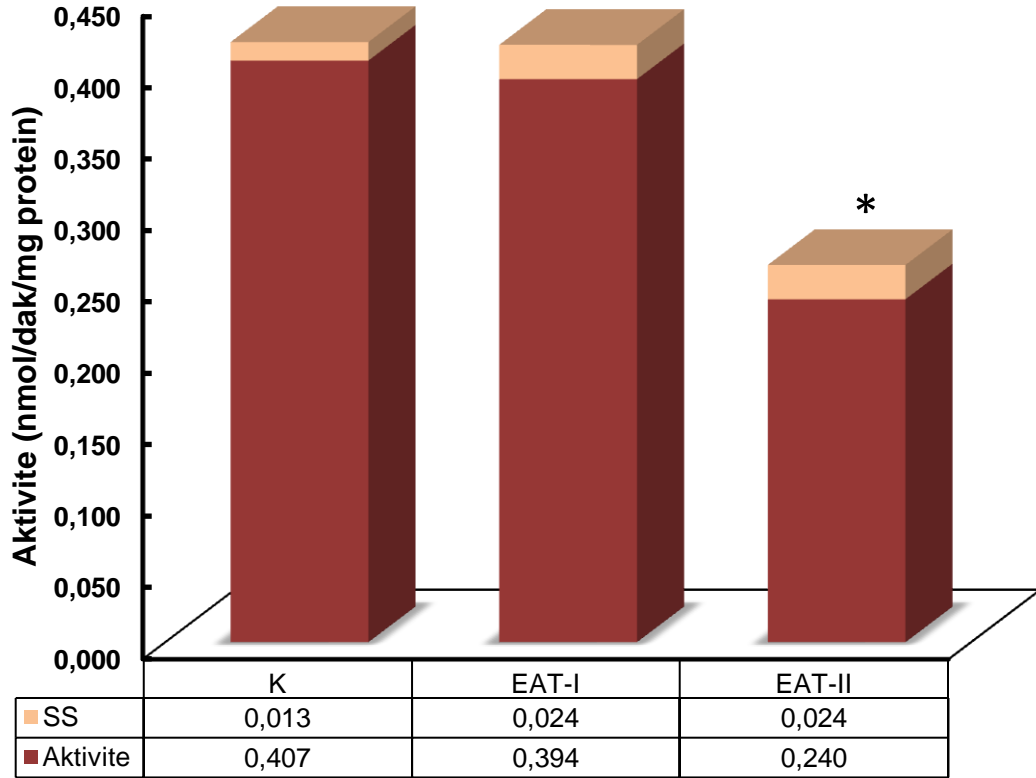
Tablo 3.5: Kafein aktivitesi (C3ND).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,385	0,012
K2	0,418	0,011
K3	0,396	0,014
K4	0,424	0,014
K5	0,394	0,016
K6	0,436	0,017
K7	0,362	0,014
K8	0,382	0,012
K9	0,424	0,010
K10	0,448	0,011
EAT1	0,424	0,009
EAT2	0,436	0,009
EAT3	0,485	0,006
EAT4	0,397	0,016
EAT5	0,455	0,012
EAT6	0,421	0,014
EAT7	0,352	0,049
EAT8	0,339	0,036
EAT9	0,327	0,039
EAT10	0,303	0,049
EAT11	0,217	0,040
EAT12	0,255	0,041
EAT13	0,215	0,013
EAT14	0,233	0,023
EAT15	0,227	0,016
EAT16	0,339	0,019
EAT17	0,282	0,014
EAT18	0,213	0,015
EAT19	0,203	0,024
EAT20	0,211	0,034

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



## Kafein



\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).

Şekil 3.4: Kafein aktivitesi (C3ND).

### 3.3.2. CYP2B Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

#### 3.3.2.1. Benzfetamin (BPND)

Sitokrom P4502B aktivitesi sıçan doku mikrozomlarında benzfetamin substratı kullanılarak çalışılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir. Doku mikrozomlarındaki benzfetamin aktivitesi, Ueng ve ark. (2002) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir.

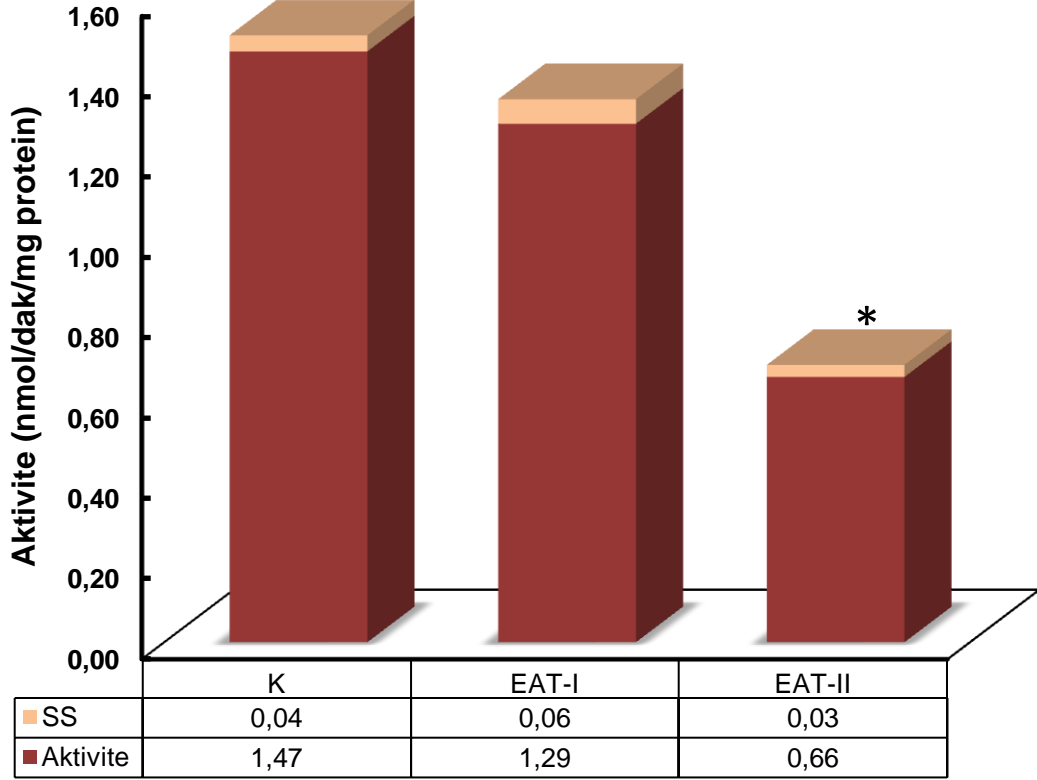
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.6 ve Şekil 3.5'te gösterilmektedir.

Tablo 3.6: Benzfetamin aktivitesi (BPND).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	1,96	0,23
K2	1,00	0,06
K3	1,46	0,11
K4	1,16	0,06
K5	2,44	0,51
K6	1,20	0,00
K7	1,88	0,11
K8	1,16	0,06
K9	1,36	0,23
K10	1,04	0,23
EAT1	1,32	0,17
EAT2	1,28	0,27
EAT3	1,60	0,28
EAT4	1,56	0,23
EAT5	1,78	0,21
EAT6	0,99	0,23
EAT7	0,94	0,23
EAT8	1,02	0,11
EAT9	1,46	0,00
EAT10	0,98	0,11
EAT11	0,40	0,23
EAT12	0,68	0,06
EAT13	0,72	0,12
EAT14	0,52	0,57
EAT15	0,78	0,13
EAT16	0,84	0,06
EAT17	0,66	0,17
EAT18	0,63	0,19
EAT19	0,67	0,12
EAT20	0,69	0,13

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

## BPND



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.5: Benzfetamin aktivitesi (BPND).

### 3.3.2.2. Etilmorfin (EmND)

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

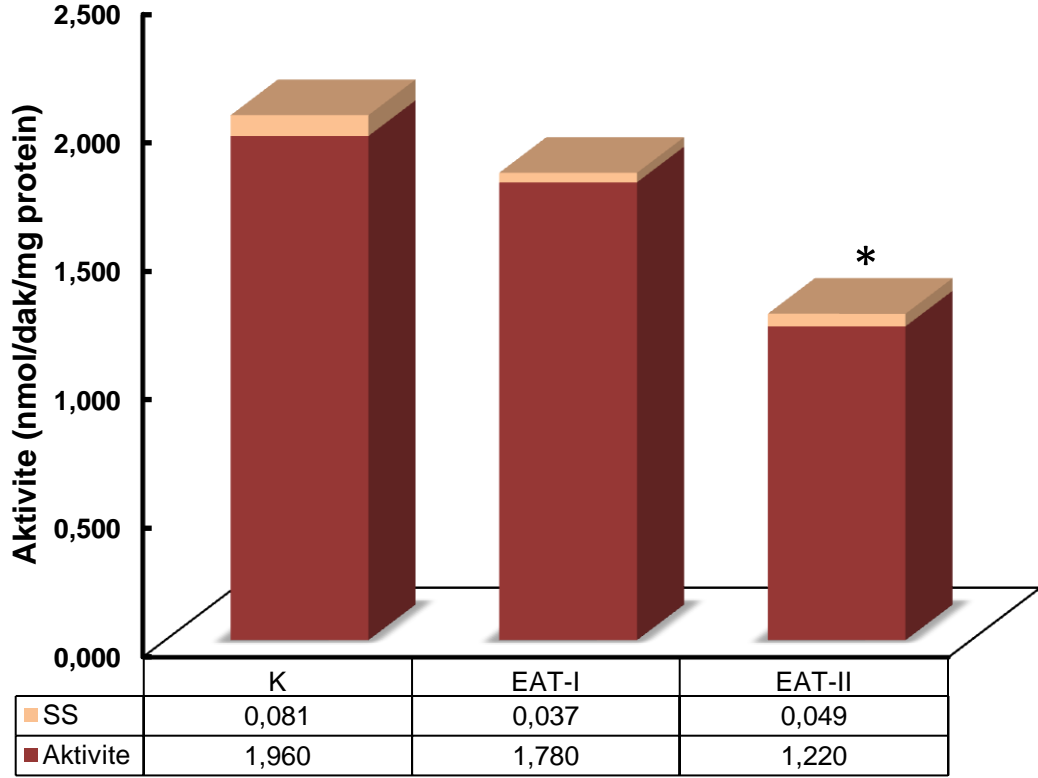
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.7 ve Şekil 3.6'de gösterilmektedir.

Tablo 3.7: Etilmorfin aktivitesi (EmND).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	1,954	0,144
K2	1,948	0,118
K3	1,833	0,013
K4	2,417	0,013
K5	1,956	0,026
K6	1,815	0,236
K7	1,625	0,079
K8	2,233	0,026
K9	2,257	0,092
K10	1,620	0,065
EAT1	1,167	0,079
EAT2	1,491	0,065
EAT3	2,213	0,013
EAT4	1,811	0,052
EAT5	1,802	0,039
EAT6	2,130	0,052
EAT7	1,685	0,039
EAT8	1,717	0,000
EAT9	1,976	0,013
EAT10	1,816	0,013
EAT11	1,213	0,013
EAT12	1,491	0,065
EAT13	1,391	0,004
EAT14	0,941	0,079
EAT15	1,183	0,065
EAT16	1,259	0,105
EAT17	1,185	0,079
EAT18	1,241	0,052
EAT19	1,152	0,017
EAT20	1,145	0,013

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

## EmND



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

Şekil 3.6: Etilmorfin aktivitesi (EmND).

### 3.3.2.3. BROD

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

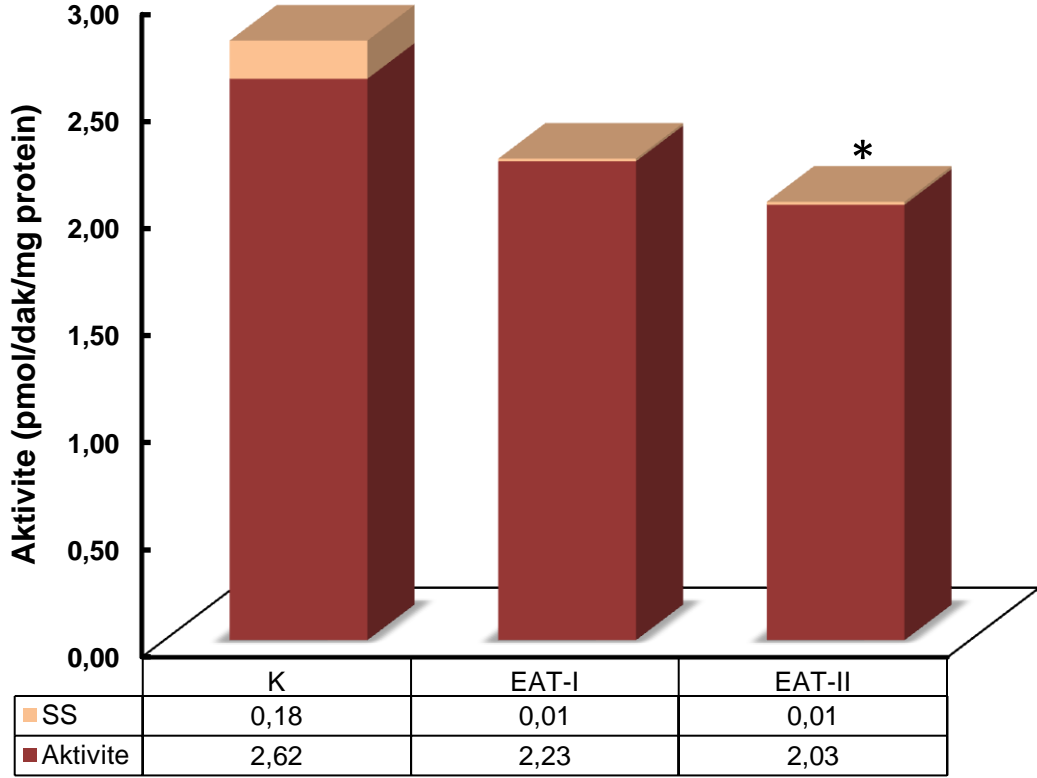
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.8 ve Şekil 3.7'de gösterilmektedir.

Tablo 3.8: BROD aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	2,230	0,057
K2	3,600	0,200
K3	1,437	0,146
K4	2,830	0,098
K5	2,450	0,089
K6	2,430	0,042
K7	3,405	0,120
K8	2,605	0,290
K9	2,780	0,707
K10	2,424	0,032
EAT1	2,327	0,016
EAT2	2,339	0,010
EAT3	2,315	0,013
EAT4	2,123	0,008
EAT5	1,745	0,009
EAT6	1,845	0,020
EAT7	2,418	0,012
EAT8	1,983	0,012
EAT9	2,323	0,011
EAT10	2,921	0,013
EAT11	2,144	0,013
EAT12	2,158	0,016
EAT13	1,848	0,015
EAT14	2,346	0,014
EAT15	1,650	0,018
EAT16	1,864	0,009
EAT17	2,161	0,015
EAT18	1,629	0,008
EAT19	1,952	0,017
EAT20	2,563	0,013

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

## BROD



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.7: BROD aktivitesi.

### 3.3.2.4. PROD

Sitokrom P4502B aktivitesi sıçan doku mikrozoamlarında 7-pentiloksirezorufin substratı kullanılarak çalışılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir. Doku mikrozoamlarındaki PROD aktivitesi Arıç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edilmiştir.

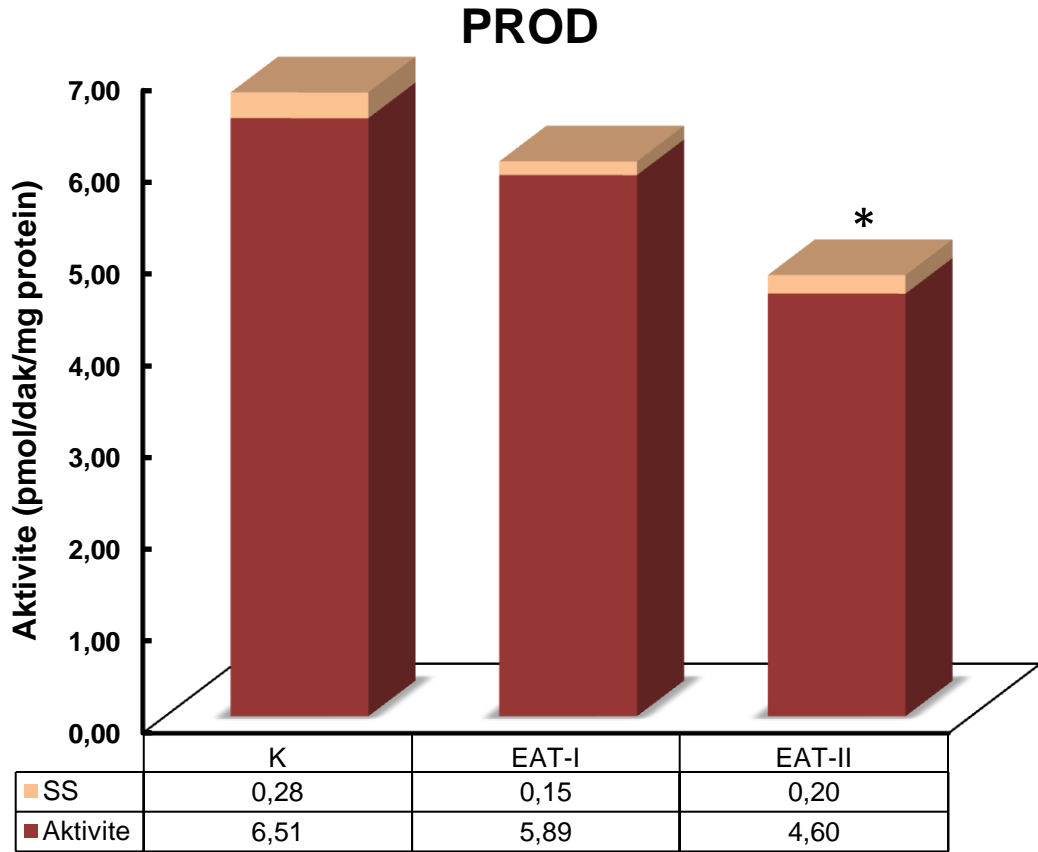
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.9 ve Şekil 3.8'de gösterilmektedir.

Tablo 3.9: PROD aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	5,735	0,092
K2	7,670	0,311
K3	5,940	0,311
K4	7,700	0,266
K5	7,470	0,441
K6	5,080	0,327
K7	5,567	0,554
K8	6,850	0,092
K9	7,805	0,064
K10	5,290	0,335
EAT1	7,710	0,017
EAT2	4,663	0,256
EAT3	4,567	0,107
EAT4	8,670	0,069
EAT5	6,635	0,078
EAT6	4,649	0,042
EAT7	5,680	0,325
EAT8	5,185	0,375
EAT9	5,325	0,092
EAT10	5,880	0,127
EAT11	4,880	0,127
EAT12	3,920	0,440
EAT13	4,855	0,403
EAT14	4,960	0,028
EAT15	3,395	0,375
EAT16	3,479	0,127
EAT17	5,800	0,156
EAT18	6,480	0,311
EAT19	4,103	0,024
EAT20	4,211	0,034

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





*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

Şekil 3.8: PROD aktivitesi.

### 3.3.3. CYP2C Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

#### 3.3.3.1. Aminopiren (APND)

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

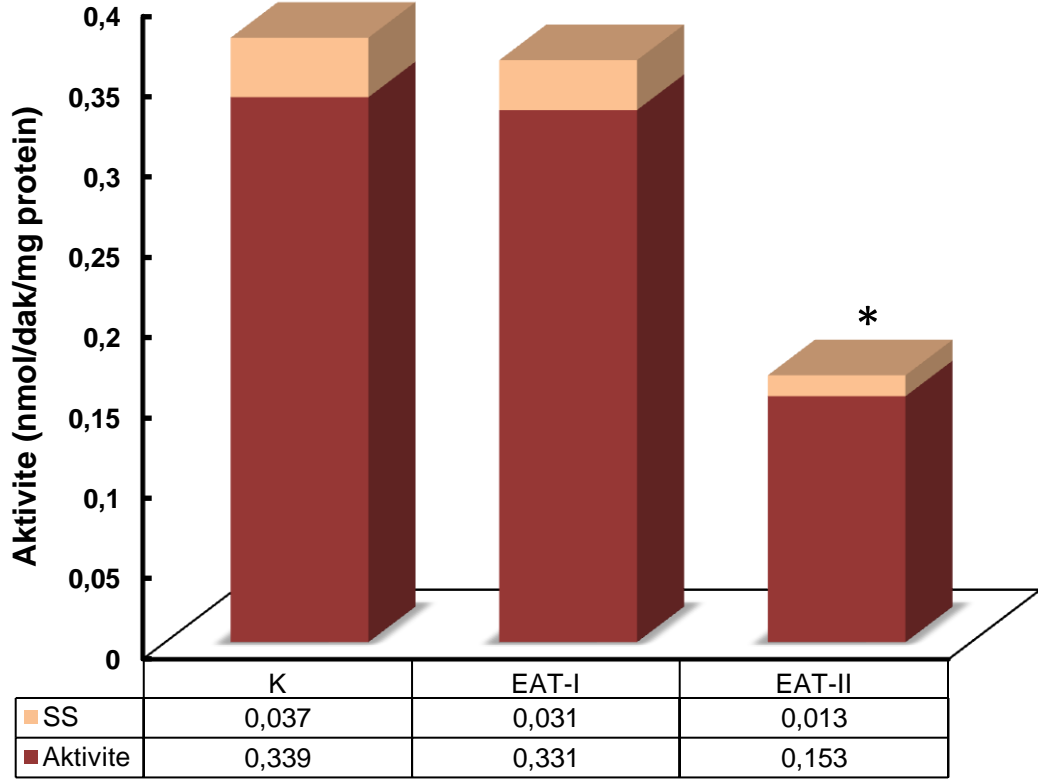
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmo/dak/mg protein olarak Tablo 3.10 ve Şekil 3.9'da gösterilmektedir.

Tablo 3.10: Aminopiren aktivitesi (APND).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,327	0,046
K2	0,339	0,043
K3	0,291	0,043
K4	0,303	0,045
K5	0,303	0,042
K6	0,279	0,017
K7	0,339	0,034
K8	0,364	0,038
K9	0,412	0,031
K10	0,424	0,032
EAT1	0,327	0,026
EAT2	0,339	0,023
EAT3	0,315	0,033
EAT4	0,352	0,034
EAT5	0,352	0,029
EAT6	0,327	0,033
EAT7	0,352	0,032
EAT8	0,343	0,032
EAT9	0,303	0,031
EAT10	0,301	0,033
EAT11	0,144	0,013
EAT12	0,158	0,016
EAT13	0,148	0,015
EAT14	0,146	0,014
EAT15	0,165	0,018
EAT16	0,164	0,009
EAT17	0,161	0,015
EAT18	0,152	0,008
EAT19	0,152	0,017
EAT20	0,145	0,013

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

## Aminopiren



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.9: Aminopiren aktivitesi (APND).

### 3.3.4. CYP2E Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

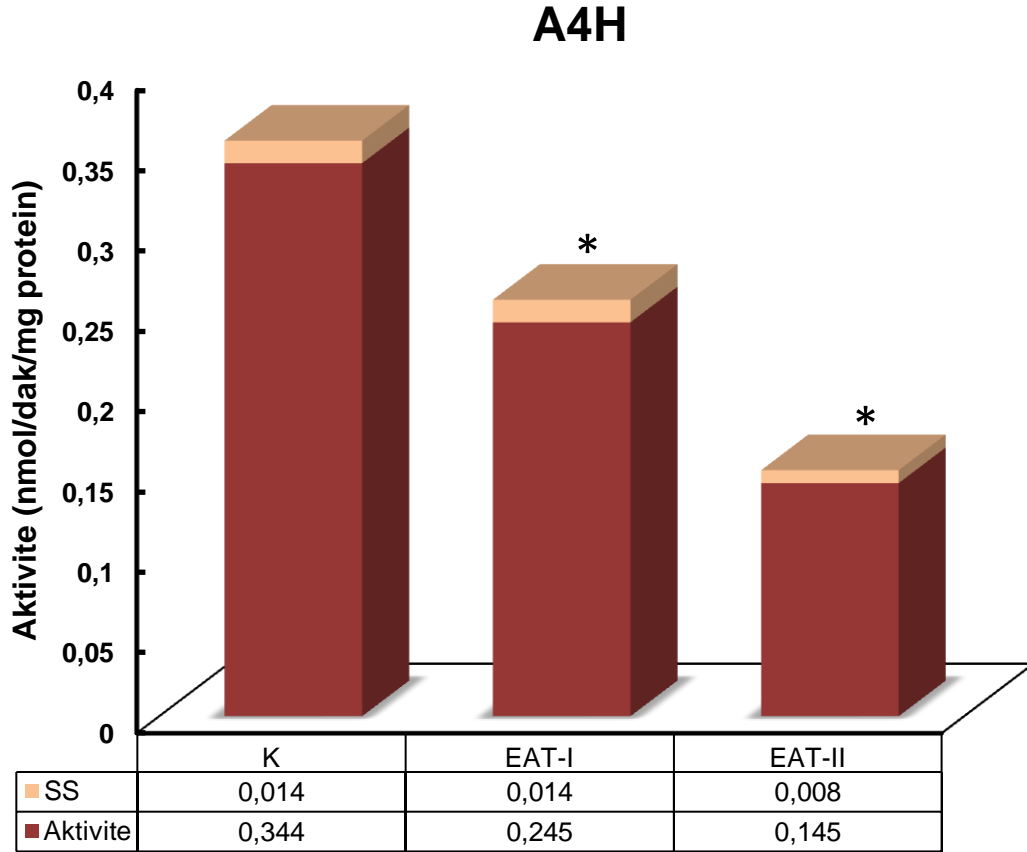
#### 3.3.4.1. Anilin 4-Hidroksilaz Aktivitesi (A4H)

Sitokrom P4502E1 sıçan doku mikrozoamlarında anilin substratı kullanılarak çalışılmıştır. Doku mikrozoamlarındaki anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, Imai ve ark. (1966) tarafından önerilen metoda göre p-aminofenol (pAP) miktarının ölçülmesiyle tespit edildi. Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.11 ve Şekil 3.10'da gösterilmektedir.

Tablo 3.11: Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg prt)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,342	0,019
K2	0,332	0,006
K3	0,323	0,028
K4	0,308	0,000
K5	0,349	0,013
K6	0,350	0,012
K7	0,348	0,014
K8	0,346	0,012
K9	0,342	0,016
K10	0,400	0,019
EAT1	0,222	0,014
EAT2	0,256	0,016
EAT3	0,233	0,016
EAT4	0,251	0,013
EAT5	0,254	0,013
EAT6	0,242	0,012
EAT7	0,240	0,016
EAT8	0,253	0,019
EAT9	0,243	0,003
EAT10	0,254	0,013
EAT11	0,124	0,006
EAT12	0,116	0,006
EAT13	0,133	0,006
EAT14	0,109	0,008
EAT15	0,196	0,010
EAT16	0,182	0,010
EAT17	0,189	0,006
EAT18	0,153	0,009
EAT19	0,113	0,008
EAT20	0,138	0,009

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



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.10: Anilin 4-hidroksilaz aktivitesi (A4H).

### 3.3.4.2. N-Nitrosodimetilamin N-Demetilaz (NDMA)

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

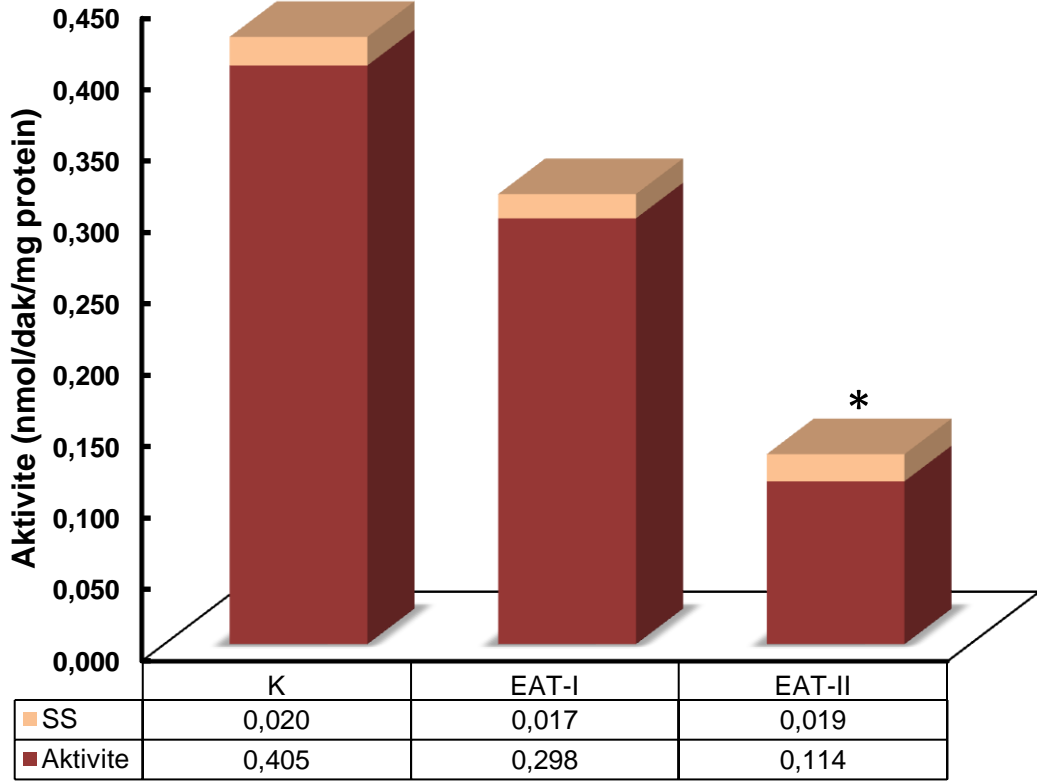
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.12 ve Şekil 3.11’de gösterilmektedir.

Tablo 3.12: NDMA aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,424	0,019
K2	0,434	0,028
K3	0,413	0,000
K4	0,400	0,057
K5	0,394	0,009
K6	0,382	0,019
K7	0,407	0,019
K8	0,404	0,035
K9	0,371	0,016
K10	0,416	0,000
EAT1	0,247	0,038
EAT2	0,253	0,009
EAT3	0,307	0,009
EAT4	0,303	0,009
EAT5	0,333	0,019
EAT6	0,293	0,038
EAT7	0,316	0,019
EAT8	0,317	0,019
EAT9	0,317	0,000
EAT10	0,294	0,009
EAT11	0,110	0,047
EAT12	0,120	0,019
EAT13	0,127	0,028
EAT14	0,113	0,009
EAT15	0,118	0,009
EAT16	0,127	0,019
EAT17	0,127	0,019
EAT18	0,107	0,000
EAT19	0,097	0,009
EAT20	0,097	0,028

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

## NDMA



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.11: NDMA aktivitesi.

### 3.3.5. CYP3A Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

#### 3.3.5.1. Eritromisin (ErND)

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

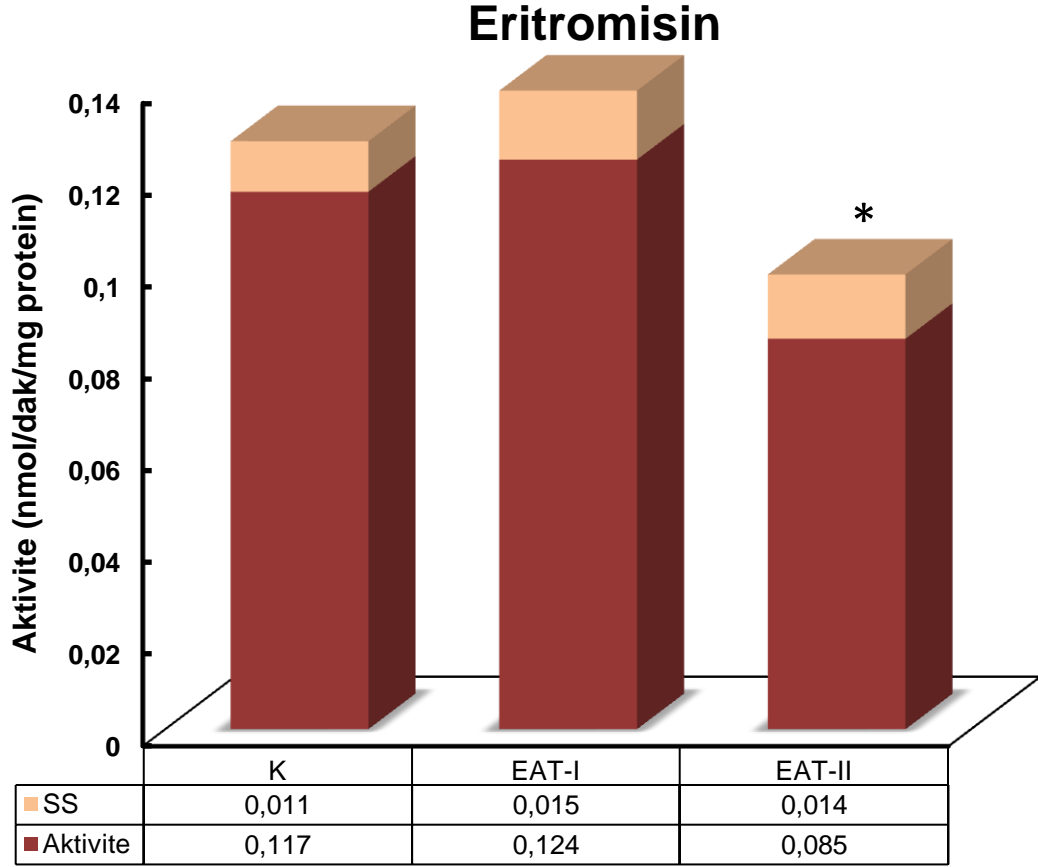
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmo/dak/mg protein olarak Tablo 3.13 ve Şekil 3.12’de gösterilmektedir.

Tablo 3.13: Eritromisin aktivitesi (ErND).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,073	0,008
K2	0,103	0,009
K3	0,139	0,009
K4	0,121	0,014
K5	0,115	0,009
K6	0,097	0,018
K7	0,139	0,009
K8	0,154	0,009
K9	0,109	0,017
K10	0,117	0,012
EAT1	0,115	0,009
EAT2	0,121	0,017
EAT3	0,127	0,009
EAT4	0,160	0,017
EAT5	0,132	0,009
EAT6	0,115	0,009
EAT7	0,145	0,000
EAT8	0,103	0,032
EAT9	0,093	0,031
EAT10	0,131	0,033
EAT11	0,074	0,013
EAT12	0,081	0,016
EAT13	0,084	0,015
EAT14	0,076	0,014
EAT15	0,105	0,018
EAT16	0,114	0,009
EAT17	0,081	0,015
EAT18	0,072	0,008
EAT19	0,085	0,017
EAT20	0,075	0,013

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





*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).*

Şekil 3.12: Eritromisin aktivitesi (ErND).

### 3.3.6. CYP19 Enzim Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

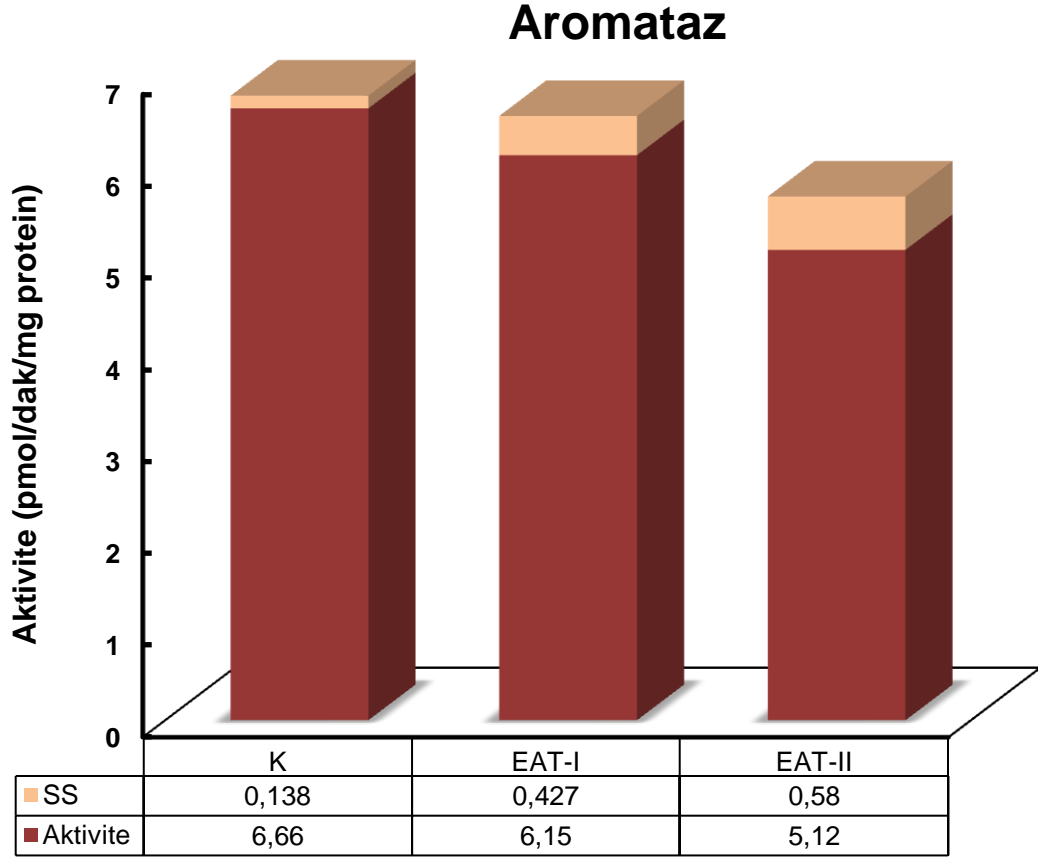
#### 3.3.6.1. Aromataz Aktivitesi (DBFOD)

CYP19 aktivitesi sıçan doku mikrozomlarında dibenzilfloresin O-debenzilaz substratı kullanılarak çalışılmıştır. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir. Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite pmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.14 ve Şekil 3.13'de gösterilmektedir.

Tablo 3.14: Aromataz aktivitesi (DBFOD).

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (pmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	6,76	0,11
K2	6,86	0,11
K3	6,50	0,09
K4	6,78	0,19
K5	6,78	0,09
K6	6,63	0,06
K7	6,51	0,01
K8	6,54	0,40
K9	6,68	0,18
K10	6,60	0,05
EAT1	6,82	0,21
EAT2	5,85	0,76
EAT3	5,85	0,11
EAT4	6,07	0,31
EAT5	6,06	0,64
EAT6	5,78	0,71
EAT7	6,56	0,31
EAT8	6,79	0,32
EAT9	5,85	0,76
EAT10	5,85	1,11
EAT11	5,59	0,22
EAT12	5,12	0,74
EAT13	5,78	0,92
EAT14	5,46	0,78
EAT15	5,22	0,78
EAT16	4,99	0,89
EAT17	4,97	0,32
EAT18	4,87	0,35
EAT19	4,34	0,64
EAT20	4,90	0,12

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



\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).

Şekil 3.13: Aromataz aktivitesi (DBFOD).

### 3.3.7. Kinon Redüktaz (NQO1) Aktivitesi Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

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

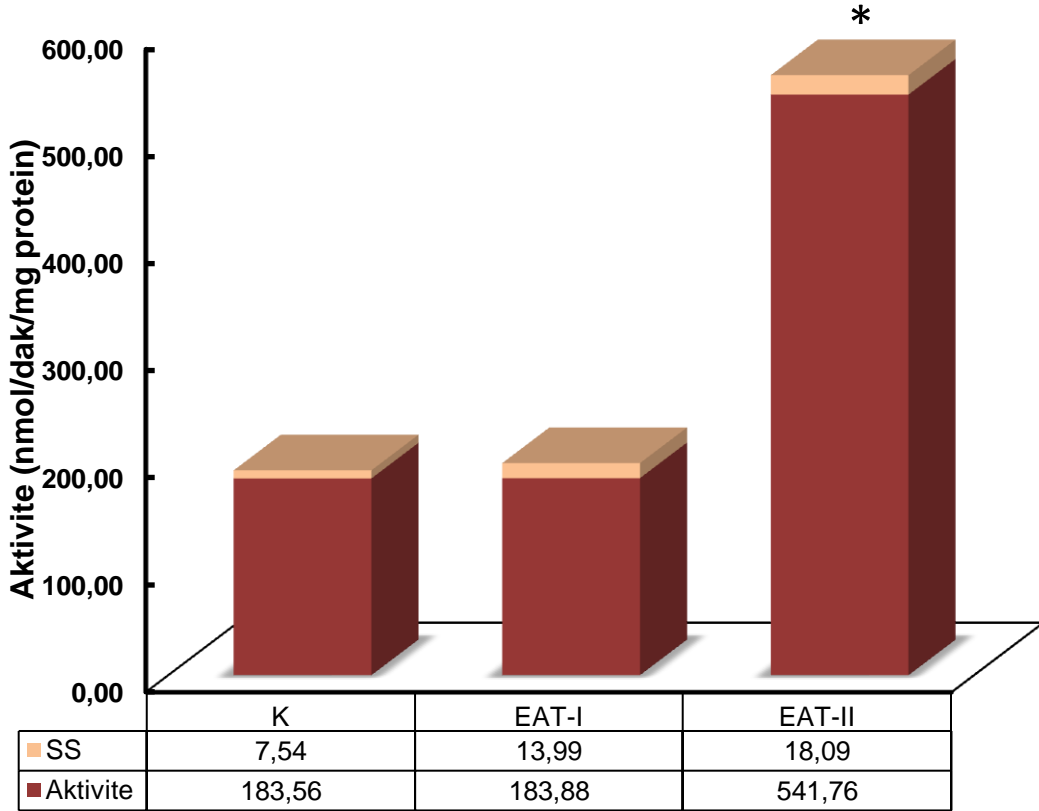
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.15 ve Şekil 3.14'de gösterilmektedir.

Tablo 3.15: NQO1 aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	156,79	3,71
K2	105,37	14,62
K3	238,47	2,36
K4	227,23	3,71
K5	82,17	6,40
K6	270,01	3,81
K7	72,31	10,47
K8	249,82	5,29
K9	326,11	6,31
K10	107,32	18,66
EAT1	196,92	12,64
EAT2	181,02	43,08
EAT3	199,45	23,02
EAT4	185,48	20,20
EAT5	197,65	0,83
EAT6	145,35	5,43
EAT7	184,56	21,91
EAT8	173,51	8,68
EAT9	180,56	1,47
EAT10	194,26	2,61
EAT11	605,41	13,88
EAT12	402,03	9,78
EAT13	651,16	43,28
EAT14	430,12	5,13
EAT15	573,31	73,89
EAT16	563,10	12,13
EAT17	565,34	7,56
EAT18	536,78	1,25
EAT19	480,94	0,59
EAT20	609,44	13,37

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

## NQO1



\* Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 3.14: NQO1 aktivitesi.

### 3.3.8. Glutatyon S-Transferaz Aktiviteleri Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), etakrinik asit (EA) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Sen ve Kirikbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir.

#### 3.3.8.1. GST- CDNB

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Sen ve Kirikbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir.

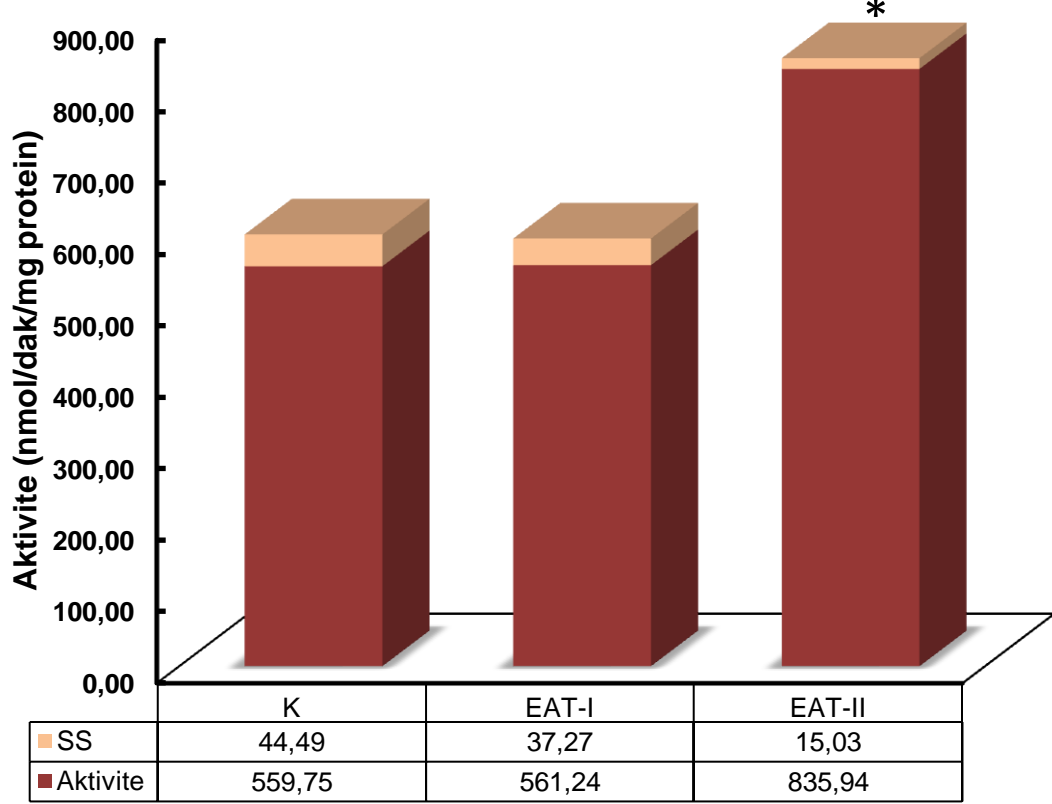
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.16 ve Şekil 3.15'te gösterilmektedir.

Tablo 3.16: GST-CDNB aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	479,34	23,90
K2	548,20	47,96
K3	528,42	19,06
K4	536,70	67,65
K5	512,05	65,37
K6	598,36	40,98
K7	570,23	38,56
K8	563,99	73,49
K9	496,83	38,47
K10	763,37	29,43
EAT1	566,33	58,81
EAT2	440,03	7,68
EAT3	598,02	5,93
EAT4	579,87	20,68
EAT5	507,84	57,97
EAT6	539,29	47,09
EAT7	564,28	60,70
EAT8	601,19	41,93
EAT9	620,35	5,85
EAT10	595,19	66,07
EAT11	864,20	10,38
EAT12	829,84	7,71
EAT13	803,63	9,92
EAT14	794,94	34,74
EAT15	875,20	23,85
EAT16	906,09	2,41
EAT17	900,47	27,57
EAT18	769,80	15,68
EAT19	786,89	4,27
EAT20	828,37	13,76

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

## GST-CDNB



\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).

Şekil 3.15: GST-CDNB aktivitesi.

### 3.3.8.2. GST- DCNB

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Sen ve Kirikbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir.

Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.17 ve Şekil 3.16'da gösterilmektedir.

Tablo 3.17: GST-DCNB aktivitesi.

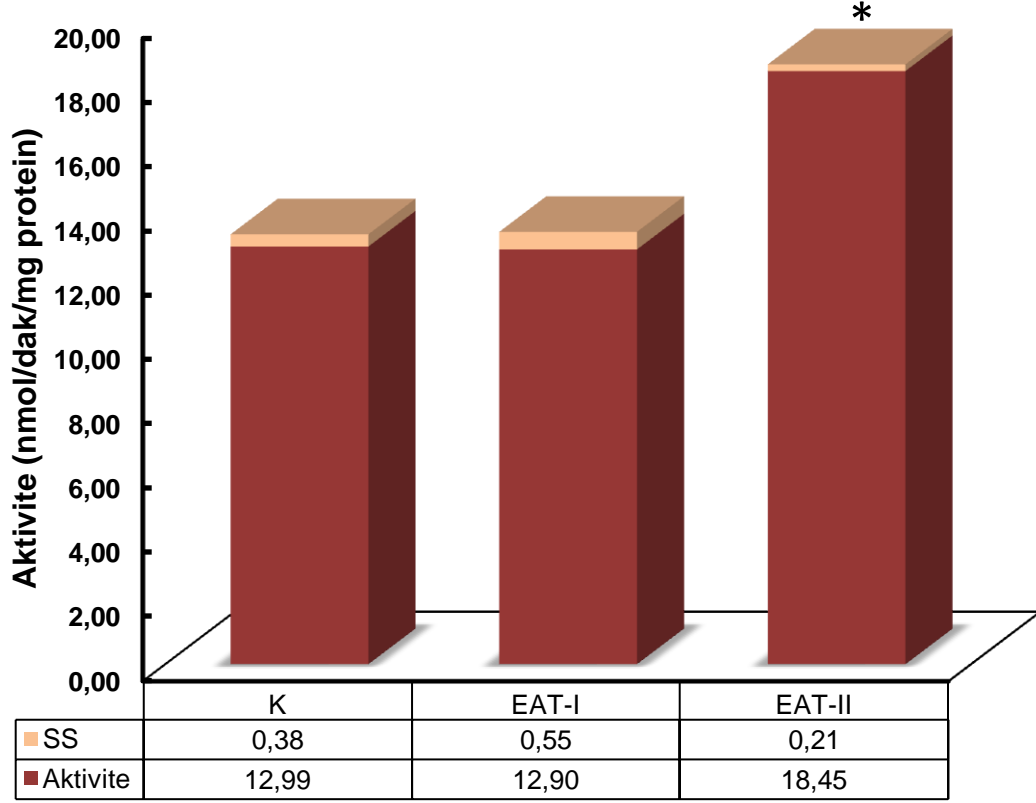
Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	12,327	0,046
K2	10,927	0,274
K3	10,426	0,023
K4	8,680	0,980
K5	7,359	0,060
K6	12,398	0,197
K7	18,423	0,800
K8	14,937	0,703
K9	16,929	0,520
K10	17,521	0,249
EAT1	9,198	1,058
EAT2	10,967	0,058
EAT3	17,922	1,778
EAT4	11,960	0,000
EAT5	14,988	0,562
EAT6	9,989	0,848
EAT7	15,923	0,536
EAT8	12,640	0,262
EAT9	11,734	0,197
EAT10	13,269	0,162
EAT11	19,940	0,040
EAT12	12,733	0,229
EAT13	19,999	0,162
EAT14	16,571	0,024
EAT15	19,294	0,194
EAT16	22,926	0,168
EAT17	13,947	0,147



EAT18	16,186	0,179
EAT19	17,355	0,204
EAT20	25,969	0,716

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

## GST-DCNB



\*, Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).

Şekil 3.16: GST-DCNB aktivitesi.

### 3.3.8.3. GST- EA

Hazırlanan doku sitozollerinde GST aktivitesi etakrinik asit (EA) substratı kullanılarak Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla ve Sen ve Kirikbakan'ın (2004) optimize ettiği şartlar kullanılarak tayin edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir.

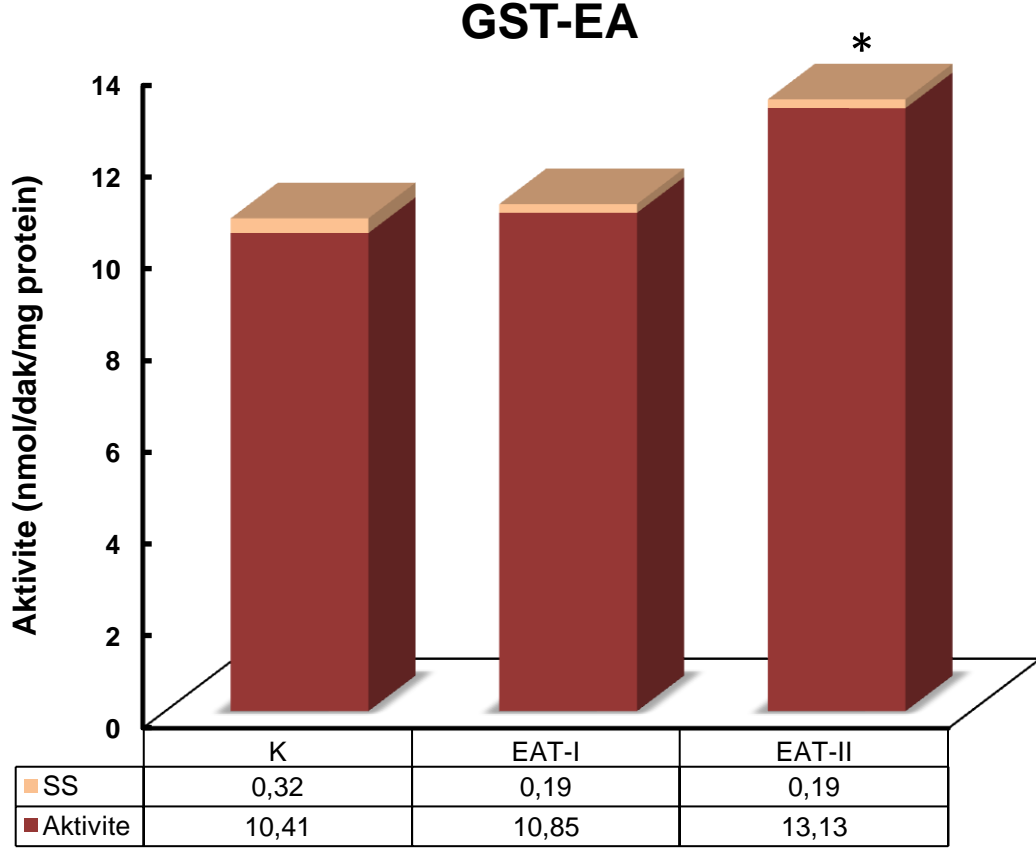
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.18 ve Şekil 3.17'de gösterilmektedir.

Tablo 3.18: GST-EA aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	10,25	0,12
K2	11,28	0,08
K3	11,26	0,04
K4	9,13	1,29
K5	9,20	0,89
K6	9,12	0,04
K7	9,23	0,15
K8	10,25	0,36
K9	11,59	0,15
K10	12,83	0,10
EAT1	10,45	0,10
EAT2	11,64	0,17
EAT3	9,88	0,07
EAT4	10,63	0,10
EAT5	10,44	0,11
EAT6	11,08	0,27
EAT7	8,15	0,82
EAT8	13,22	0,05
EAT9	12,92	0,01
EAT10	10,17	0,28
EAT11	12,02	0,08
EAT12	11,32	0,07
EAT13	14,13	0,26
EAT14	12,70	0,19
EAT15	11,10	0,25
EAT16	15,43	0,05
EAT17	12,80	0,39

EAT18	12,71	0,34
EAT19	13,10	0,06
EAT20	16,00	0,24

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



\*, Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 3.17: GST-EA aktivitesi.

### 3.3.9. Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Ellajik Asitin Etkisi

#### 3.3.9.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi

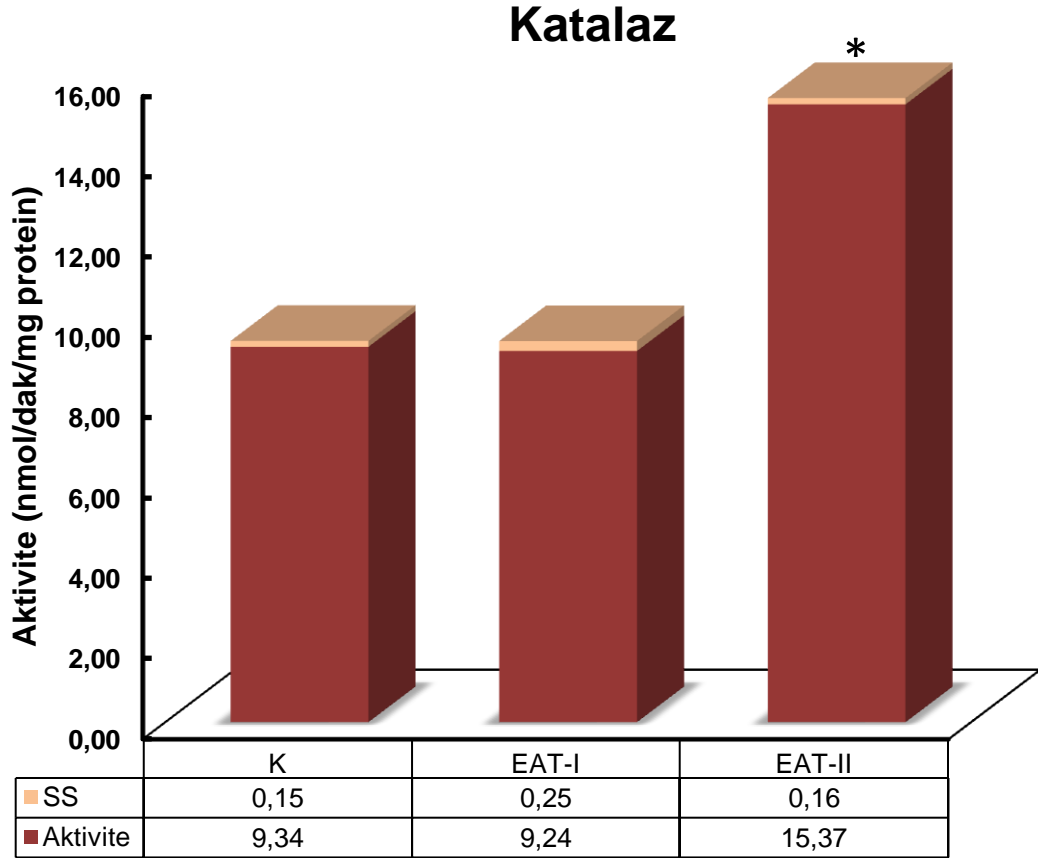
Katalaz enziminin aktivite ölçümü S1.5 fraksiyonunda Abei (1974) tarafından tarif edilen spektrofotometrik metot kullanılarak tayin edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar belirlenmiştir.

Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.19 ve Şekil 3.18'de gösterilmektedir.

Tablo 3.19: Katalaz aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	9,02	0,15
K2	8,11	0,13
K3	7,27	0,18
K4	9,16	0,13
K5	10,17	0,12
K6	9,18	0,14
K7	10,04	0,13
K8	9,12	0,16
K9	10,19	0,24
K10	11,13	0,09
EAT1	9,12	0,49
EAT2	9,05	0,12
EAT3	9,12	0,09
EAT4	10,21	0,36
EAT5	8,09	0,24
EAT6	9,11	0,45
EAT7	10,12	0,16
EAT8	8,18	0,17
EAT9	9,12	0,16
EAT10	10,24	0,24
EAT11	15,19	0,16
EAT12	16,15	0,13
EAT13	15,20	0,09
EAT14	14,22	0,27
EAT15	16,13	0,22
EAT16	15,62	0,11
EAT17	13,81	0,14
EAT18	16,12	0,13
EAT19	15,15	0,17
EAT20	16,15	0,13

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



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

Şekil 3.18: Katalaz aktivitesi.

### 3.3.9.2. Glutatyon Perkosidaz (GPX) Aktivitesi

GPx enziminin aktivite ölçümü Paglia ve Valentine (1967) spektrofotometrik metodu kullanılarak tayin edilmiştir.

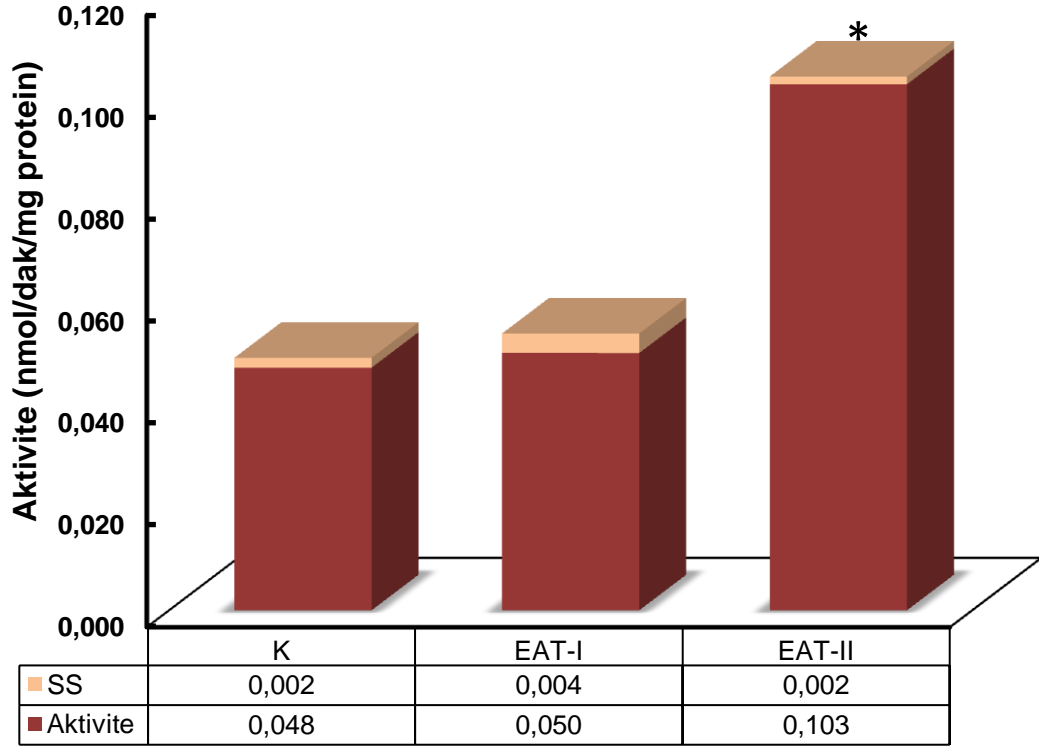
Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite nmol/dak/mg protein olarak Tablo 3.20 ve Şekil 3.19'da gösterilmektedir.

Tablo 3.20: GPX aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)	
	Ortalama	Standart Sapma (SS)
K1	0,047	0,002
K2	0,041	0,006
K3	0,032	0,000
K4	0,032	0,001
K5	0,051	0,002
K6	0,058	0,000
K7	0,052	0,001
K8	0,079	0,001
K9	0,036	0,002
K10	0,047	0,003
EAT1	0,067	0,001
EAT2	0,046	0,004
EAT3	0,074	0,003
EAT4	0,045	0,006
EAT5	0,049	0,011
EAT6	0,034	0,006
EAT7	0,039	0,003
EAT8	0,049	0,002
EAT9	0,043	0,000
EAT10	0,058	0,002
EAT11	0,122	0,001
EAT12	0,115	0,001
EAT13	0,093	0,004
EAT14	0,081	0,001
EAT15	0,113	0,001
EAT16	0,106	0,002
EAT17	0,115	0,000
EAT18	0,098	0,002
EAT19	0,092	0,001
EAT20	0,098	0,003

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

## GPX



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

Şekil 3.19: GPX aktivitesi.

### 3.3.9.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

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

Kontrol ve EAT enjekte edilmiş sıçan karaciğerlerindeki spesifik aktivite unite/dak/mg protein olarak Tablo 3.21 ve Şekil 3.20'de gösterilmektedir.

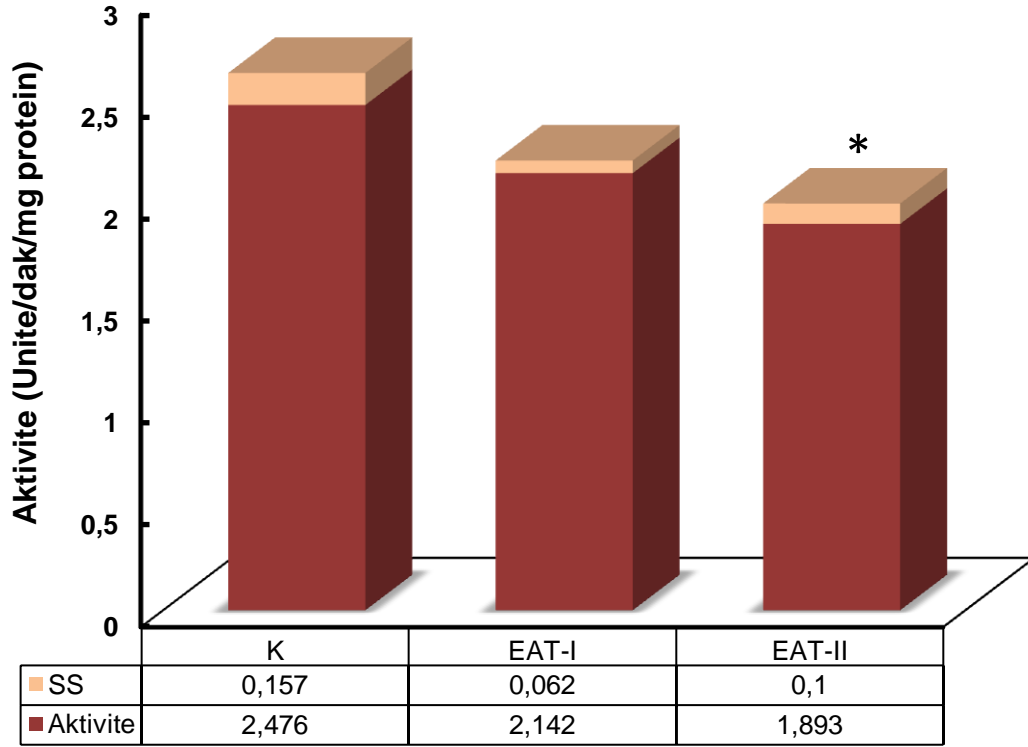
Tablo 3. 21: SOD aktivitesi.

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Unite/dak/mg protein)	
	Ortalama	SS
K1	2,74	0,14
K2	2,64	0,13
K3	2,96	0,1
K4	2,19	0
K5	2,32	0,02
K6	2,62	0,13
K7	2,44	0,02
K8	2,71	0,04
K9	1,04	0,53
K10	3,1	0,46
EAT1	1,68	0,05
EAT2	2,38	0
EAT3	2,34	0,03
EAT4	2,58	0,06
EAT5	2,69	0,14
EAT6	1,34	0,09
EAT7	2,14	0,01
EAT8	2,15	0,08
EAT9	2,83	0,04
EAT10	1,29	0,12
EAT11	1,44	0,02
EAT12	1,52	0
EAT13	1,84	0,16
EAT14	1,96	0,03
EAT15	1,44	0,02
EAT16	1,92	0,1
EAT17	2,15	0,04
EAT18	2,47	0,24
EAT19	2,48	0,02
EAT20	1,71	0,37

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



## SOD



*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

Şekil 3.20: SOD aktivitesi.

### 3.3.10. Diagnostik Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Saptanması

#### 3.3.10.1. Serum Aminotransferazların Tayini: (AST ve ALT)

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edilmiştir. (Tablo 3.22)

Tablo 3.22: AST-ALT aktivitesi

	Aspartat Aminotransferaz (AST) Ünite/dak/mg protein	Alanin Aminotransferaz (ALT) Ünite/dak/mg protein
<b>Kontrol</b>	1,53 ± 0,12	1,33 ± 0,19
<b>10 mg/kg EAT</b>	1,55 ± 0,16	1,38 ± 0,21
<b>30 mg/kg EAT</b>	1,54 ± 0,21	1,34 ± 0,12

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

Ellajik asitin sıçan karaciğer Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri üzerine etkileri genel derleme olarak Tablo 3.23’de gösterilmektedir.

Tablo 3.23: 30 mg/kg ellajik asitin sıçan karaciğer Faz I, Faz II ve antioksidan enzim aktiviteleri, mRNA ve protein düzeyleri üzerine kontrole oranla yüzde değişim oranları.

		Aktivite (%)	Protein (western blot) (%)	mRNA (RT-PCR) (X kat)
CYP1A1	EROD	11↓	25↓	1.01 X↓
CYP1A2	MROD	13 ↓	-	2.29 X↓
	C3ND	39 ↓		
CYP2B	EmND	38 ↓	56↓	2.31 X↓
	BPND	55 ↓		
	BROD	23 ↓		
	PROD	30 ↓		
CYP2C	APND	55 ↓	27↓	2.43 X↓
CYP2E	A4H	58 ↓	47↓	1.43 X↓
	NDMA	56 ↓		
CYP3A	ERND	28 ↓	-	-
CYP19	DBFOD	24 ↓	19 ↓	1.03 X↓
Antioksidan	NQO1	194 ↑	-	4.5 X↑
	GST-CDNB	49 ↓	-	2.62 X↓
	GST-DCNB	42 ↓	-	-
	GST- EA	33 ↓	-	-
	CAT	64 ↑	-	-
	GPX	114 ↑	-	-
	SOD	24 ↓	-	-

### 3.3.11. Ellajik Asitin Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

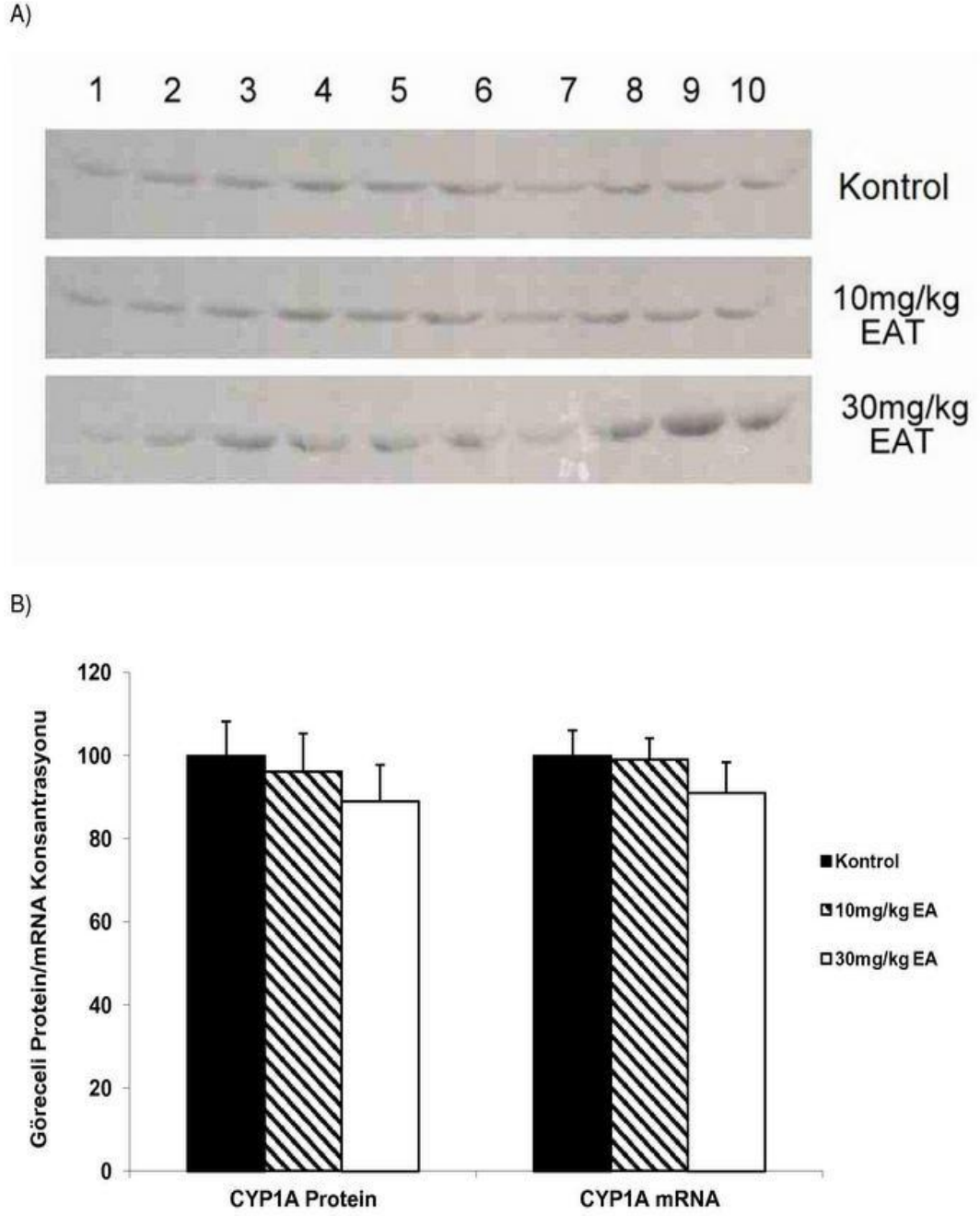
#### 3.3.11.1. Protein ve mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Ellajik asitin karaciğer mikrozomal monooksijenaz izozimleri üzerine olan etkileri Western blot ve RT-PCR ile gerçekleştirilmiştir.

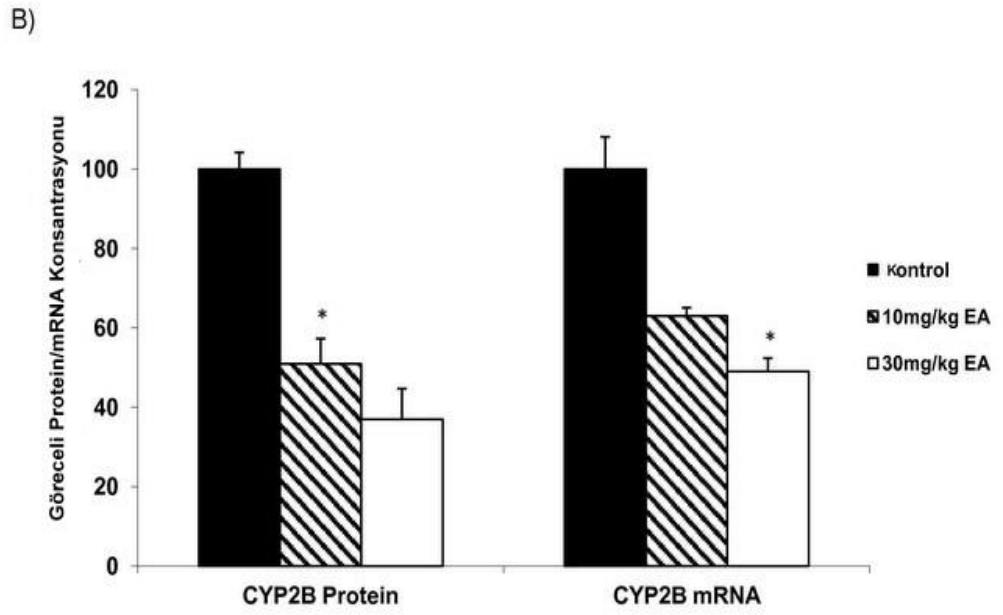
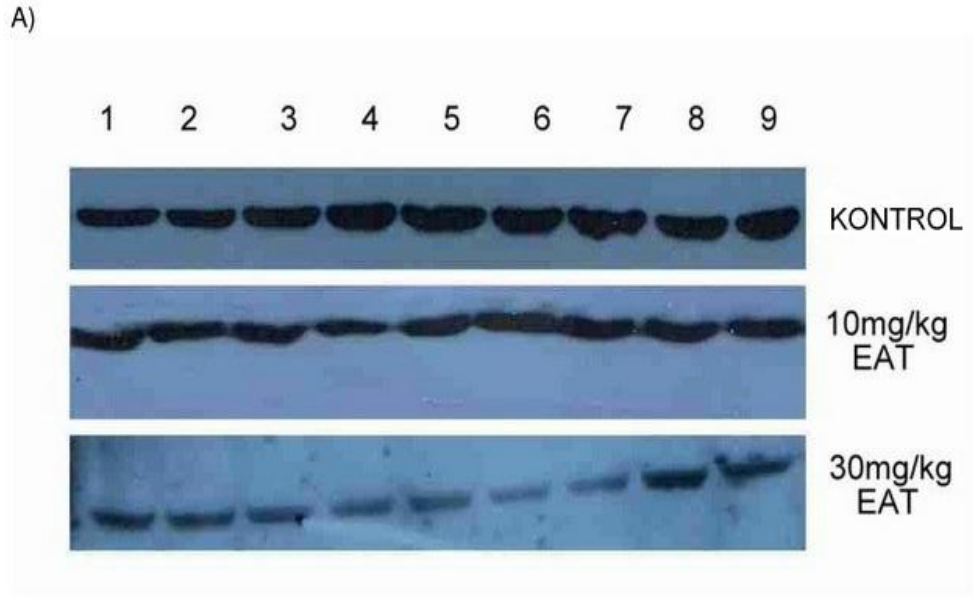
Protein örneğinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekillerde verilmektedir. (Şekil 3.21-3.26) Tüm örneklerdeki blot görüntü analizleri Scion Image (Versiyon Beta, 4.0.2 ) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

mRNA düzeyinde ekspresyonu saptamak için öncelikle çalışılan her bir gen için amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve erime

eğrisi analizleri yapılmıştır. Daha sonra bu değerler kullanılarak her bir enzim için mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol ve EA verilen gruplarda saptanmıştır.



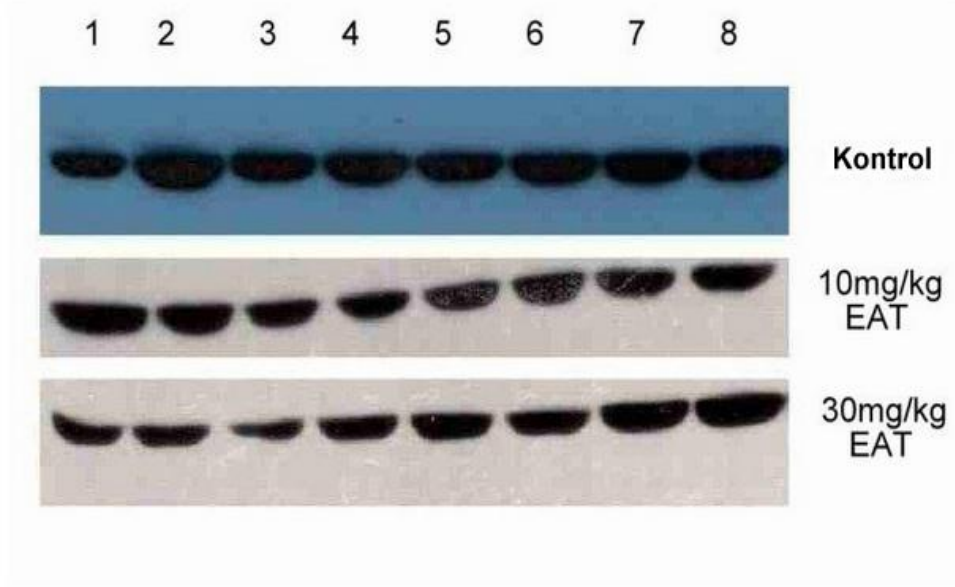
Şekil 3.21: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP1A üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve gerçek zamanlı PCR analizi.



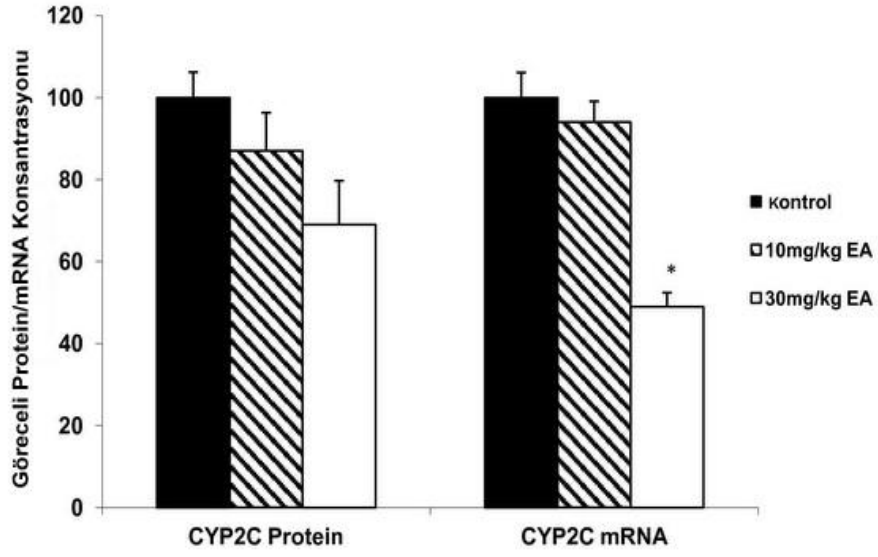
*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P < 0.05$ ).*

Şekil 3.22: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2B üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve gerçek zamanlı PCR analizi.

A)



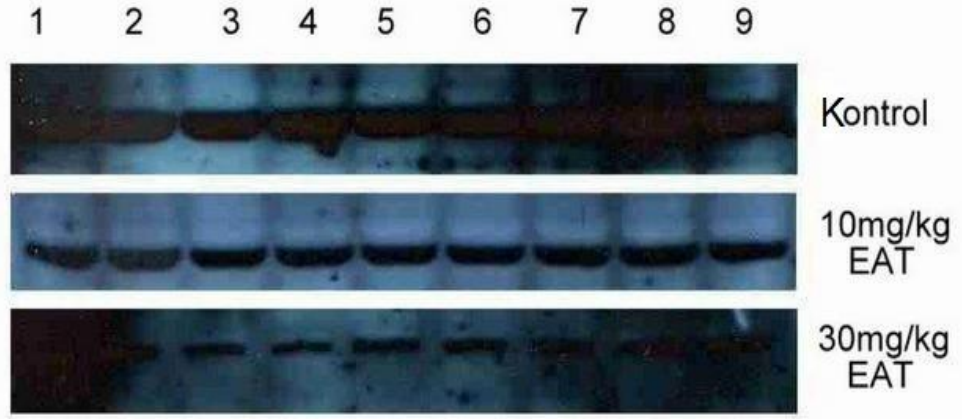
B)



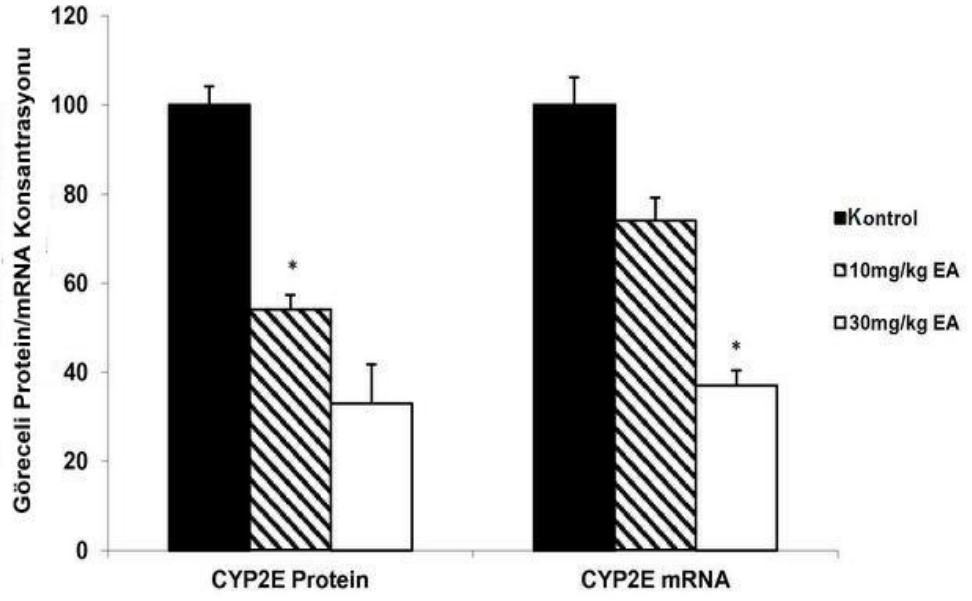
\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 3.23: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2C8 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi.

A)



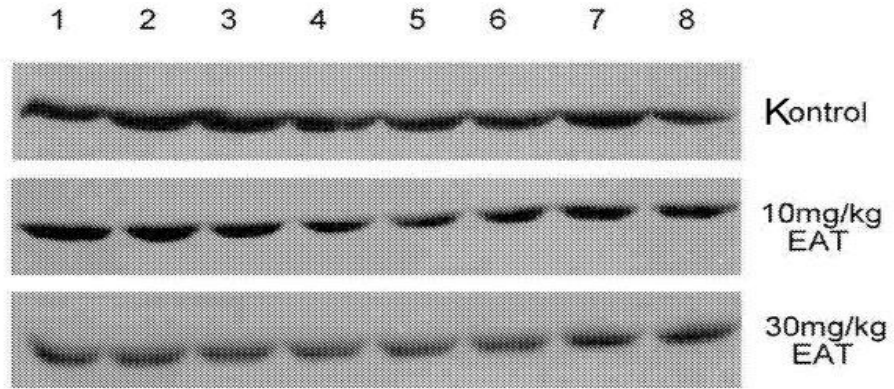
B)



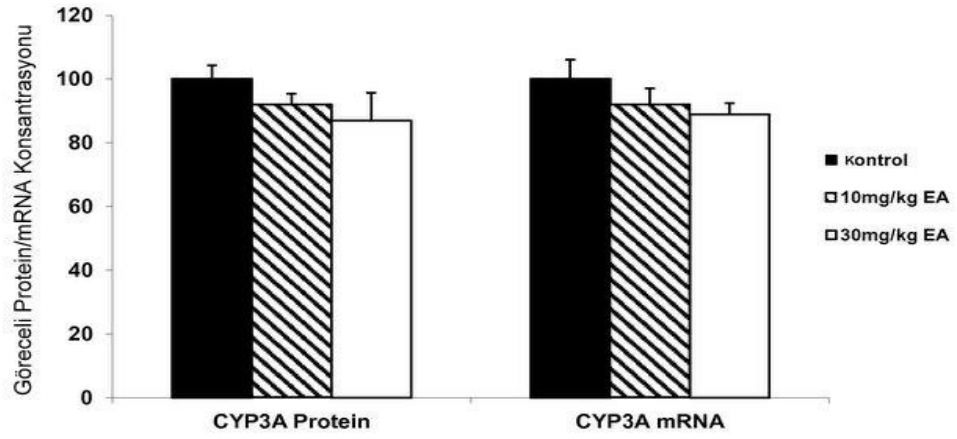
\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir ( $P<0.05$ ).

Şekil 3.24: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP2E1 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi.

A)

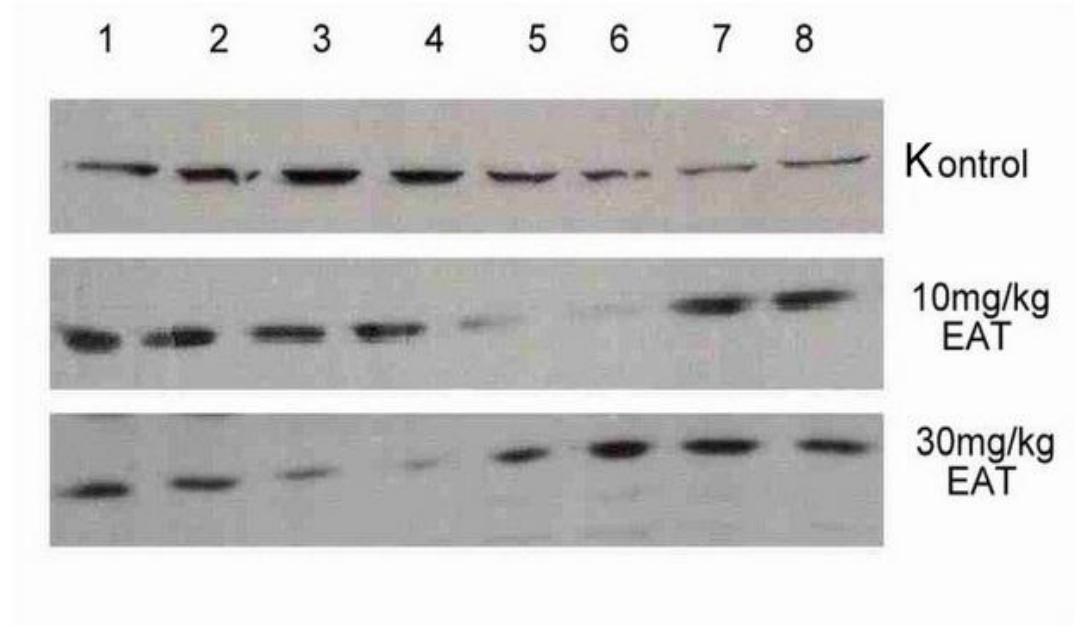


B)

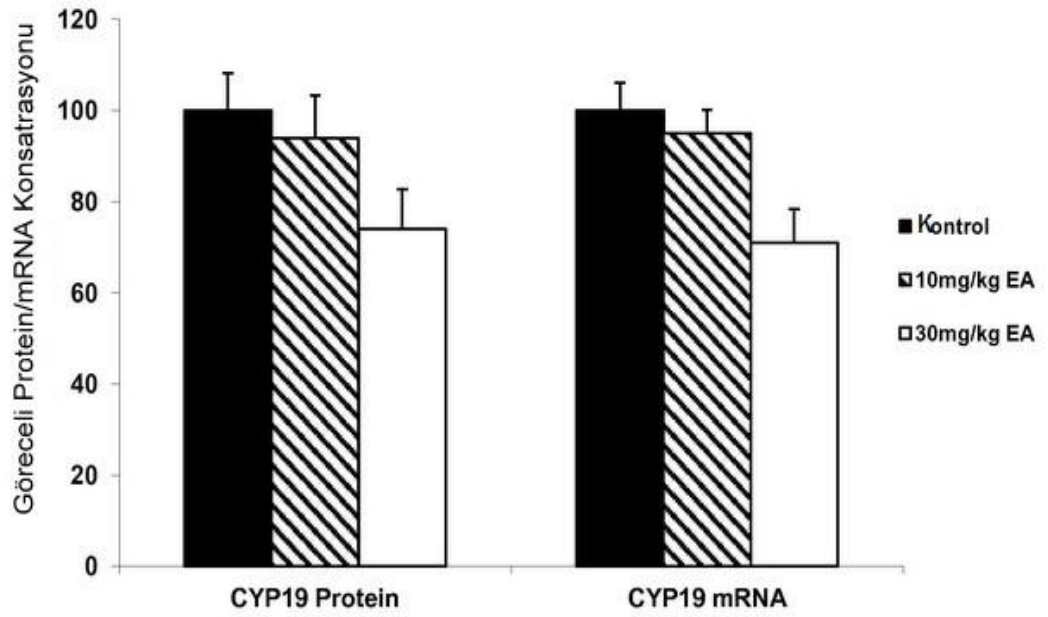


Şekil 3.25: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP3A1 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western Blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi.

A)



B)



Şekil 3.26: Ellajik asitin karaciğer mikrozomal CYP19 üzerine olan etkileri A) Western blot B) Western blot ve Gerçek zamanlı PCR analizi.



### 3.3.12. Hücre Kültürü ve Ellajik Asitin Uygulanması

#### 3.3.12.1. Ellajik Asitin Değişik Hücre Hatlarına Sitotoksik Etkileri

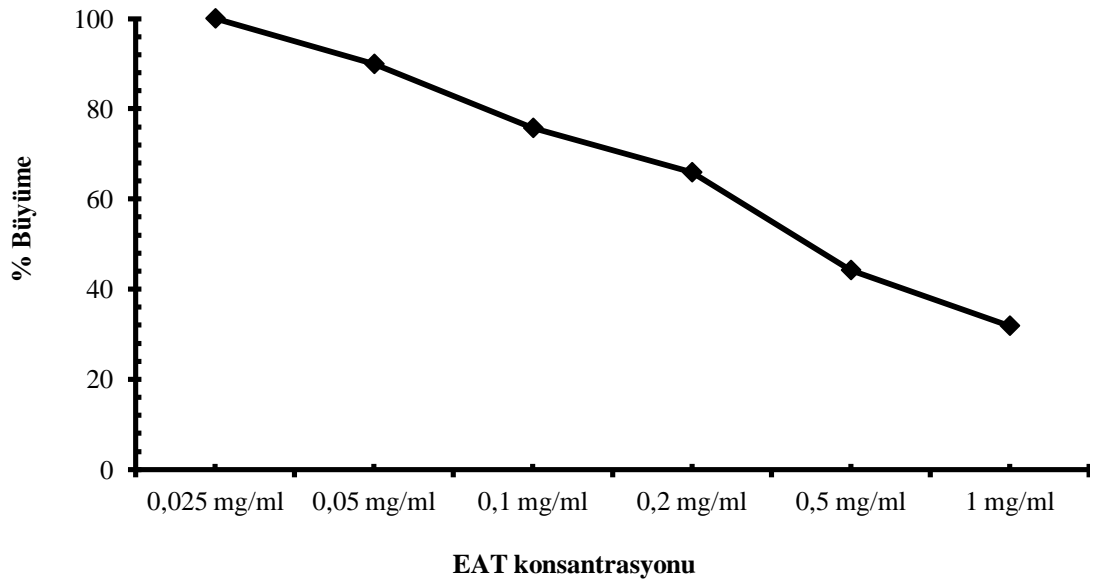
Ellajik asitin değişik hücre hatlarında gösterdiği sitotoksik etkiler aşağıdaki şekil ve tablolarda verilmektedir (Tablo 3.24-3.27, Şekil 3.27-3.30).

##### 3.3.12.1.1. İnsan Embriyonik Böbrek 293 hücreleri

Tablo 3.24: Ellajik asitin insan embriyonik böbrek 293 hücrelerine sitotoksik etkisi.

Ellajik Asit Konsantrasyon (mg/ml)	Ortalama % yaşam	Standart Sapma (SS)
0,025 mg/ml	98,125	0,006
0,05 mg/ml	89,907	0,007
0,1 mg/ml	75,716	0,009
0,2 mg/ml	65,881	0,008
0,5 mg/ml	44,190	0,004
1 mg/ml	31,840	0,015

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



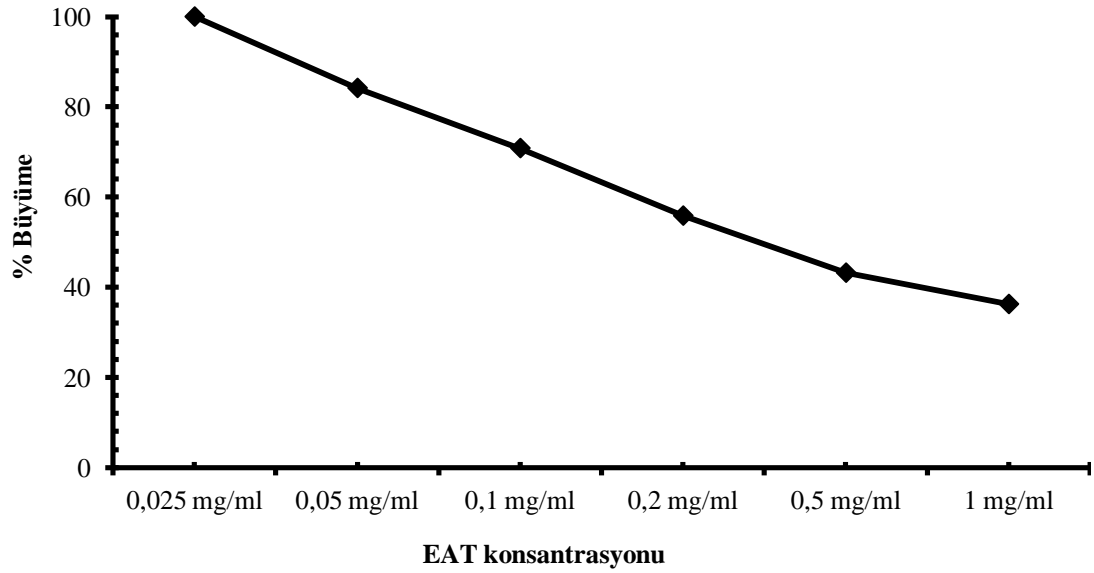
Şekil 3.27: Ellajik asitin insan embriyonik böbrek 293 hücrelerine sitotoksik etkisi.

### 3.3.10.1.2. İnsan Fibroblastik 3T3 hücre hattı

Tablo 3.25: Ellajik asitin insan fibroblastik 3T3 hücrelerine sitotoksik etkisi.

Ellajik Asit Konsantrasyon (mg/ml)	Ortalama % yaşam	Standart Sapma (SS)
0,025 mg/ml	97,784	0,006
0,05 mg/ml	84,172	0,003
0,1 mg/ml	70,831	0,004
0,2 mg/ml	55,857	0,010
0,5 mg/ml	43,197	0,005
1 mg/ml	36,255	0,003

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



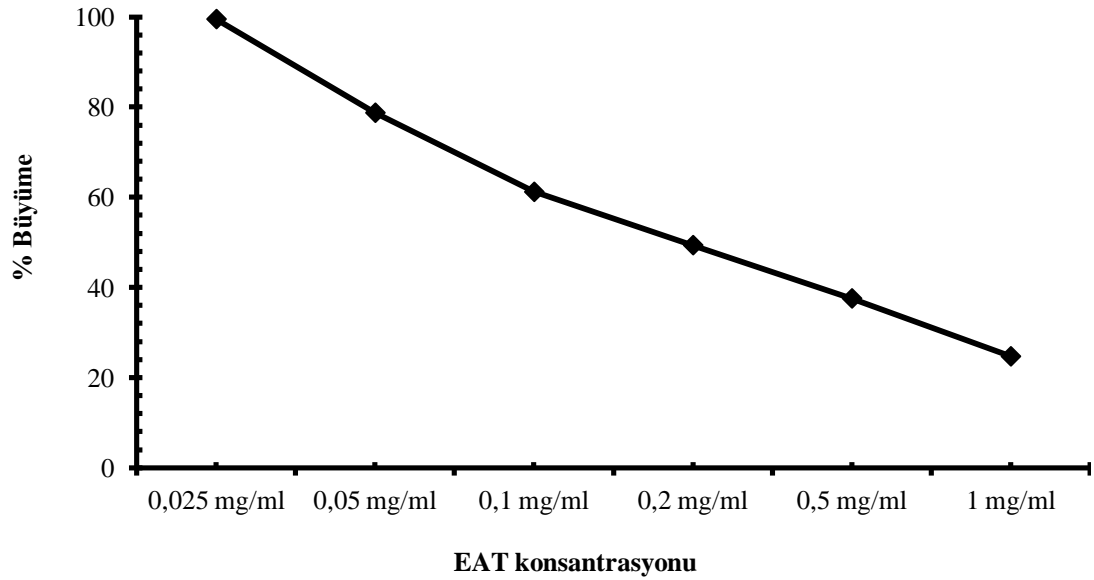
Şekil 3.28: Ellajik asitin insan fibroblastik 3T3 hücrelerine sitotoksik etkisi.

### 3.3.12.1.3. İnsan Meme Kanseri MCF-7 hücre hattı

Tablo 3.26: Ellajik asitin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisi.

Ellajik Asit Konsantrasyon (mg/ml)	Ortalama % yaşam	Standart Sapma (SS)
0,025 mg/ml	99,507	0,026
0,05 mg/ml	78,737	0,008
0,1 mg/ml	61,190	0,004
0,2 mg/ml	49,373	0,026
0,5 mg/ml	37,556	0,023
1 mg/ml	24,709	0,007

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



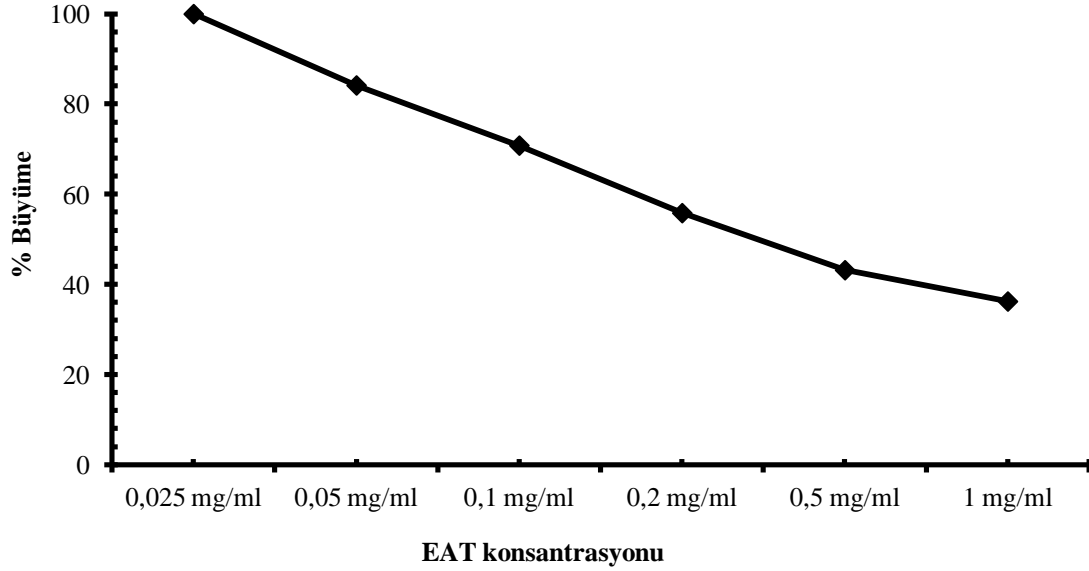
Şekil 3.29: Ellajik asitin insan meme kanseri MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkisi.

### 3.3.12.1.4. İnsan Akciğer Kanseri PC-14 hücre hattı

Tablo 3.27: Ellajik asitin insan akciğer kanseri PC-14 hücrelerine sitotoksik etkisi

Ellajik Asit Konsantrasyon (mg/ml)	Ortalama % yaşam	Standart Sapma (SS)
0,025 mg/ml	96,378	0,004
0,05 mg/ml	85,987	0,006
0,1 mg/ml	68,789	0,005
0,2 mg/ml	56,311	0,008
0,5 mg/ml	44,559	0,005
1 mg/ml	35,348	0,006

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

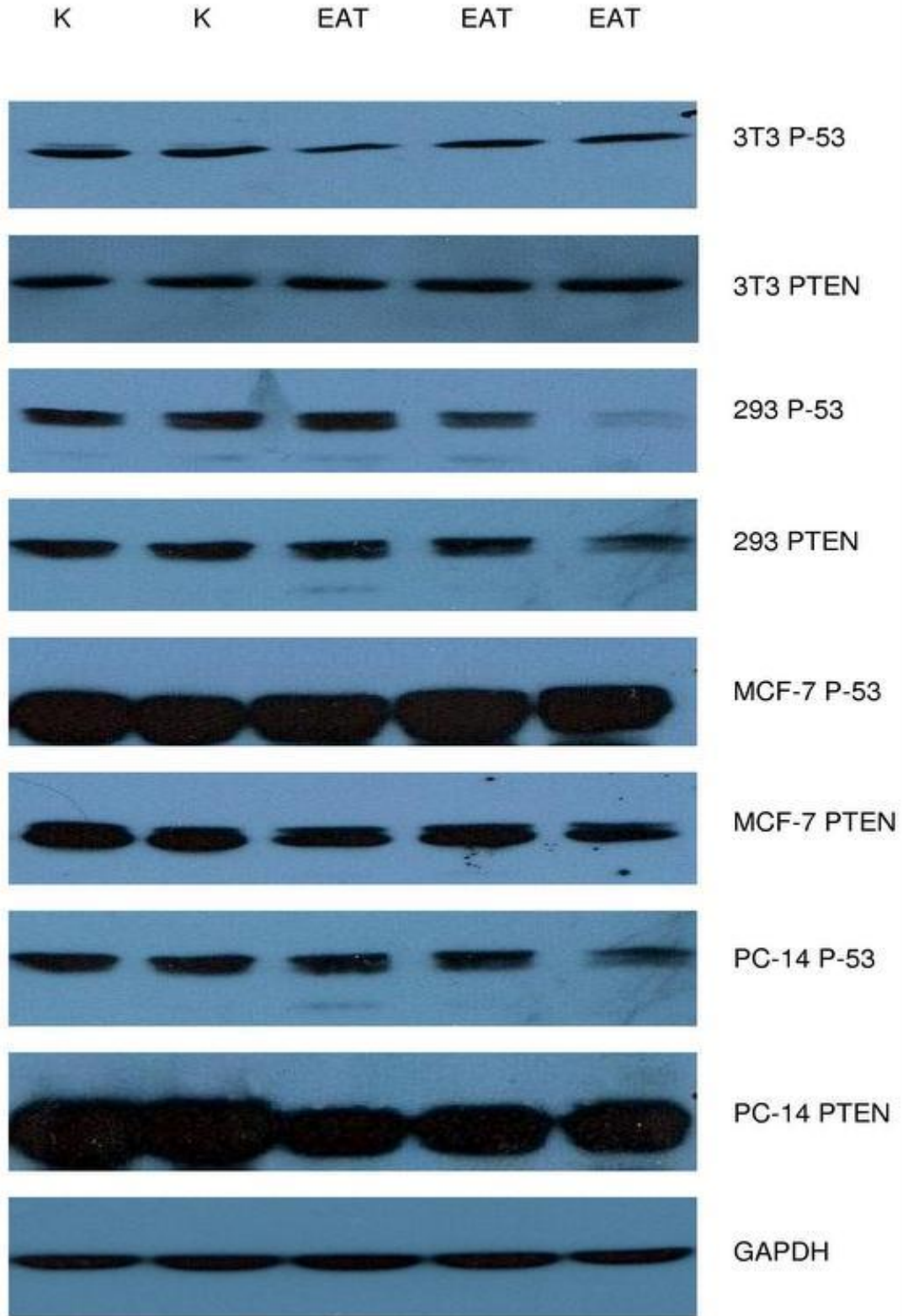


Şekil 3.30: Ellajik asitin insan akciğer kanseri PC-14 hücrelerine sitotoksik etkisi

### 3.3.12.2. Ellajik Asitin Tümör Baskılayıcı Genler Üzerine Etkisi

Ellajik asitin tümör baskılayıcı genler üzerindeki etkilerini tanımlamak için p53 ve PTEN geni ile ilgili tanımlamalar yapılmış, iç standart olarak da GAPDH geni kullanılmıştır (Şekil 3.31). Elde edilen Western blot görüntüleri aşağıdaki şekilde ve tüm örneklerin Scion Image (Version Beta, 4.0.2) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen görüntü analizleri Tablo 3.28'de sunulmaktadır.

Şekil 3.31: Ellajik asitin değişik hücre hatlarında P-53 ve PTEN genleri üzerine etkileri



Tablo 3.28: Ellajik asitin değişik hücre hatlarında P-53 ve PTEN genleri üzerine etkilerinin analizleri

<b>Tümör Basklayıcı Gen</b>	<b>Hücre Hattı</b>	<b>Kontrol (Ortalama±SS)</b>	<b>EAT (Ortalama±SS)</b>	<b>Kontrole göre % oran</b>
<b>P-53</b>	<b>3T3</b>	3600 ± 42,4	2701 ± 229,8	-25% *
	<b>MCF-7</b>	13339 ± 33,94	14250 ± 200,8	--
	<b>293</b>	6256,5 ± 24,7	6951 ± 103,2	--
	<b>PC-14</b>	5337,5 ± 14,8	5734,5 ± 23,3	--
<b>PTEN</b>	<b>3T3</b>	5159 ± 113	5188 ± 151	--
	<b>MCF-7</b>	13293,5 ± 98	9939 ± 60	-26% *
	<b>293</b>	4940 ± 50	5183 ± 46	--
	<b>PC-14</b>	16657 ± 251	10831 ± 86	-35% *

*\* , Kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmektedir (P<0.05).*

#### 4. TARTIŞMA

Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ilave olarak, teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte her gün yeni bir ilaç çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla üretilmektedir. Bunun sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar ve insanlar da kanser dâhil birçok hastalık oluşmaktadır. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Günümüzde kanser gelişiminin ve kontrolünün doğal antioksidan, anti-mutajen ve anti-karsinojen maddeler kullanılarak önlenmesi giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Bu maddeler ilaç halinde sentetik olarak ya da diyet içerisinde tabii kaynaklı bileşikler halinde bulunmaktadır [135]. Fakat birçok bitkinin içinde bulunan doğal kaynaklı anti-oksidan, anti- mutajen ve anti-karsinojen maddelerin önemi son yıllarda giderek artmaya başlamıştır. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu maddeleri içeren sebze ve meyve tüketiminin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir [136]. Ayrıca, dünyada ve de Türkiye’de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra bu maddeleri içeren bitkisel preparatları tamamlayıcı ve alternatif tedavi olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bunun sonucunda, günümüzde bu ürünlere gösterilen ilgi her geçen gün artmakta, hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu ürünlerin, ABD’de 5 milyar dolar, dünya genelinde ise 50 milyar dolarlık yıllık ticaret hacmine eriştiği belirtilmektedir. Ancak halk arasındaki yanlış yaygın kanı bu preparatların doğal olduğu ve zararsız olduğu inancının aksine bu preparatların hayati tehlike arz eden durumlar oluşturduğudur.

Bu bağlamda çalışma materyali olarak insanların sıklıkla tükettikleri besin maddeleri ile halk arasında bazı hastaların alternatif tedavisi için kullanılan bitki, meyve ve sebzelerin içeriğinde bulunmasından dolayı ellajik asit seçilmiştir. Bu

sebeple bu maddenin karsinojen/prokarsinojen bileşiklerin ve ilaçların metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450'lere olan etkisi, antikanserojen ve antioksidan etkileri araştırılmıştır.

Bu veriler ışığında öncelikle ellajik asit verilen hemen hemen tüm hayvanlarda hafif kilo kaybı gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda da benzer olarak diyabetik farelerin normal diyetlerinde ellajik asit verildikten sonra farelerde hafif bir kilo kaybı kaydedilmiştir [137, 138]. Yapılan diğer bir çalışmada ise kanserli farelere radyasyonla beraber tedavi amaçlı intraperitoneal olarak uygulanan ellajik asitten sonra farelerde hafif kilo kaybı rapor edilmiştir [139]. Bu sonuçlar bize ellajik asitten elde edilebilecek çayların düşük dozda ve devamlı tüketimi zayıflama aracı olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir.

Serum transaminaz enzim düzeylerinde bir artış veya azalış gözlenmemiş olması bu enzimlerin yaygın olarak buldukları özellikle eritrosit, kalp kası, karaciğer ve akciğer gibi dokularda herhangi bir doku harabiyeti olmadığı anlamına gelmektedir. Özellikle akut hepatik hasar göstergesi olan ALT'de bir artış meydana gelmemiş olmaması nedeni ile kullanılan ellajik asit dozlarının akut ya da kronik toksisite oluşturmadığını göstermektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda karaciğer toksisitesi gözlenen deneklerde artan transaminaz düzeyi, diyetle ellajik asit alımından sonra azalmıştır [140- 142]. Hem kendi sonuçlarımız hem de literatür çalışmalarına göre uygulanan dozlarda ellajik asit karaciğerde herhangi bir doku hasarı meydana getirmemekte aksine doku hasarı meydana geldiği durumlarda ise ellajik asit bu hasarı elimine etmektedir.

Sağlık açısından, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle doğal antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Antioksidan olarak fenolik bileşiklerin kanser başta olmak üzere çeşitli birçok hastalığı engelleyebildiği ifade edilmektedir [143-145]. Bu nedenle fenolik madde içeriği yüksek olan meyve ve sebze tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azaltmakta ve sağlık üzerine olumlu etkilerde bulunmaktadır. Ellajik asitin antioksidan özelliğini belirlemek için ellajik asit iki değişik dozda sıçanlara uygulanmış, CAT, SOD ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerine bakılmıştır. Uygulanan 10 mg/kg ellajik asit konsantrasyonunda antioksidan enzim (CAT, SOD ve GPx) aktivite düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiş olması iki şekilde



değerlendirilebilir. İlki kullanılan dozlarda herhangi bir antioksidan etki göstermemiş olabileceğidir. Diğeri yine kullanılan dozlarda EAT'nin herhangi bir oksidatif stres oluşturmamış olmasının bir göstergesi olabileceğidir. Transaminazlarda bir artış gözlenmemiş olduğu dikkate alındığında bu dozda herhangi bir oksidatif stres gözlenmemiş olduğu doğrulanmaktadır. 30mg/kg ellajik asit uygulanmış deneklerde antioksidan GPX ve CAT düzeyindeki enzim aktivite düzeylerindeki artış, bu dozda antioksidan etki gösterdiğinin göstergesidir. Tüm bu veriler kullanılan dozların doğruluğunun bir göstergesi olarak ele alınabilir. 30 mg/kg ellajik asit uygulandığında SOD aktivitesinde görülen düşüş kullanılan methodun indirek bir method olduğundan olabilir. Yapılan bir çalışmada ellajik asidin serbest oksijen radikallerinin ve kanserojenlerin reaktif metabolitlerini söndürülerek kanser başlangıcını engellediği bildirilmektedir. Metabolizmada oluşan serbest oksijen radikalleri, DNA zincirinin ayrılması ve mutasyonlara neden olmaktadır. Ellajik asit ise bu prosesi engelleyebilen kuvvetli bir antioksidandır [146]. Ayrıca nar, ahududu, çilek gibi meyvelerdeki ellajik asittin kuvvetli bir antioksidan olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [147-151].

Ellajik asit; kuvvetli bir antioksidan olmasının yanı sıra prokanserojenlerin aktivasyonunu engelleyebilen kuvvetli bir antikansorejendir [152, 153]. Son on yıl süresince, bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasallar yüksek dozlarda ve sürekli alındıklarında; kanserojen metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak kanserojenik maddelerin metabolizmasını değiştirdiği, anti-kanserojenik, anti-oksidatif, anti-mutajenik etkiler gösterdiğini bildiren kanıtlar sunulmuştur [154, 155].

Sitokrom P4501 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 izoformlarının kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokanserojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Akciğer kanseri [156], kolorektal kanser [157] ve meme kanseri [158] gibi kanserojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan birçok çalışmada çeşitli fitokimyasalların (ellajik asit, galangin, kuersetin, genistein, dimetoksiflavon, diosmetin, hidroksikalkon, biokanin, drakana cinnabari flavon vb.) CYP1 izoformlarının ekspresyonlarını veya aktivitelerini inhibe etmeleri ile çeşitli kanser türlerinde önemli baskılayıcı etkiler gösterdikleri bildirilmiştir [159-161].

Bütün P450 izoformlarının içinde CYP1A (CYP1A1 ve CY1A2) karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasında rol oynadığından öncelikli bir yer tutar. Bu iki üye potansiyel mutajenik olan benzo(a)piren, sigara dumanında ve mangalda pişirilmiş yiyeceklerde bulunan aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunda rol oynarlar [162-165]. İki değişik konsantrasyonda ellajik asit uygulanması sonucunda sadece 30 mg/kg ellajik asit uygulanan sıçanların karaciğer CYP1A'ya bağlı C3ND, MROD ve EROD aktivitelerinde baskılanma görülmüştür. Azalma görülen CYP1A grubunda yer alan C3ND, MROD ve EROD düzeylerinde gözlenen inhibisyon bu enzimlerin karsinojen metabolizmasında yer aldığı gerçeği göz önüne alındığında oldukça büyük önem arz etmektedir. Böylelikle, benzopiren gibi diyetsel ya da çevresel maruz kalınan karsinojenlerin etkilerinin azaltılmasında önemli rol oynayacaktır. Bu noktada, ellajik asitin bu enzimlerin inhibitörlerini içerdiği ya da bu enzimlerin supresyonunda rol oynayan glukokortikoid reseptörleri veya AhR reseptör ligandları içerdiği söylenebilir. Ancak CYP1A enzim düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözükmesine rağmen, protein ve mRNA seviyelerinde görülen azalma istatistiksel olarak anlamsızdır. Benzer şekilde sıçan karaciğer mikrozomlarında ellajik asitin CYP1A'nin enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu, protein ve mRNA ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir [161]. Bu da CYP1A aktivitesini gen ve protein ekspresyonu düzeyini değiştirmeden doğrudan aktiviteyi inhibe ettiğini gösterir. Muhtemelen bu *in vivo* etki ellajik asitin konsantrasyonuna bağlıdır. 10 mg/kg ellajik asit uygulandığında bir değişiklik gözlenmemiş olduğu dikkate alındığında bu sonuç bizim savımızı doğrulamaktadır.

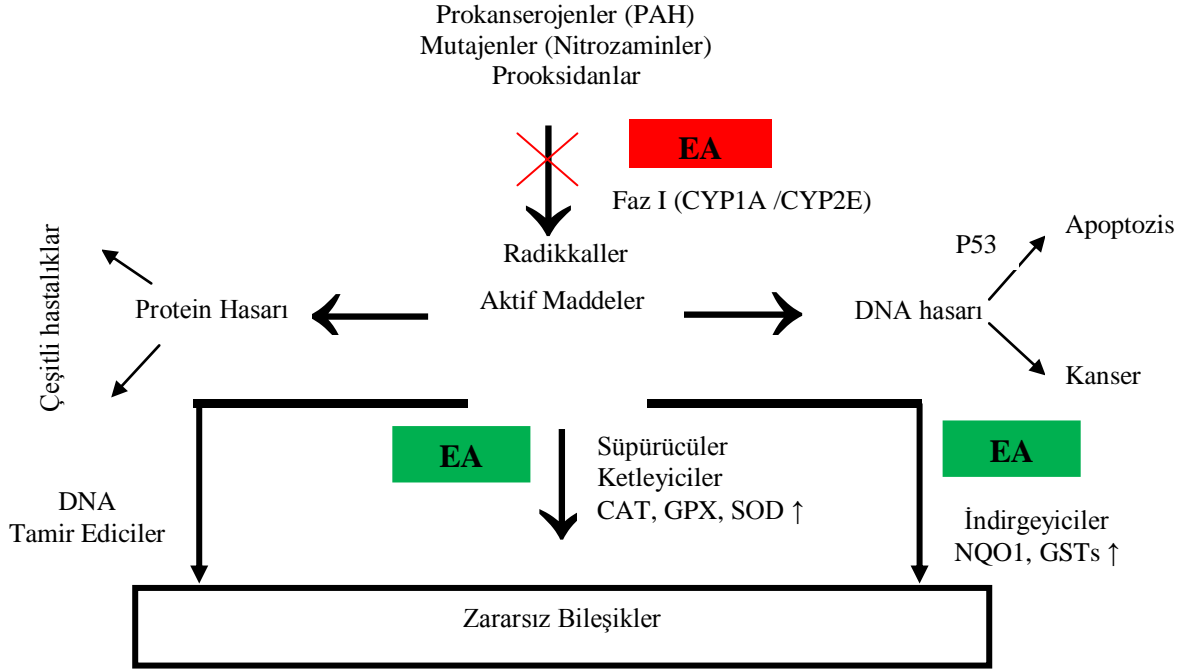
CYP2E1 etanol ile indüklenebilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilaminlerin) metabolizmasında oldukça öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. CYP1 izoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak ta kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. CYP1 ailesinde olduğu gibi çeşitli fitokimyasalların CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek veya protein düzeyini azaltarak nitrozoaminlerin karsinojenik ve mutajenik etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir [166-168].

Benzer olarak yaptığımız çalışmada da, alkol gibi düşük moleküler ağırlıklı ajanların metabolizmasında yer alan ve oksidatif ajanların üretilmesinde rolü olan CYP2E1'e bağlı aktiviteler (A4H ve NDMA) ile CYP2E1 protein ve mRNA ekspresyonlarında gözlenen azalma da yine ellajik asitin antikanserojenik etkisi olarak düşünülebilir. Ellajik asit uygulanan deneklerin CYP2E üzerindeki etkisi ya transkripsiyonel ya da post-transkripsiyonel düzeydedir. Ayrıca Wilson ve ark.ları [169] ellajik asitin NDMA aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu izoformun benzen, karbon tetraklorür ve nitrozaminler gibi birçok ksenobiyotiğin elektrofilik, mutajenik ve tümör oluşumuna neden olan metabolitlere dönüştürdüğü bilinmektedir [170-174]. Bütün bunlar, ellajik asitin antikarsinojen etkilere sahip olduğunun çok önemli ve kuvvetli delilidir.

CYP2E1 geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Yapısal çeşitlilik gösteren 70'den fazla kimyasal, CYP2E1 ile metabolize edilir. Etanol gibi alkoller, aseton gibi ketonlar, aldehitler, aromatik bileşikler, karbontetraklorür gibi halojenli küçük organik moleküller, enfluran gibi anestezipler, asetaminofen gibi ilaçlar ve N-nitrozodimetilamin (NDMA) gibi nitrozaminler, vinil / etil karbamat, anilin, stiren, benzen gibi karsinojen maddeler substratlarıdır. Çalışmamızda NDMA ve anilin aktiviteleri, protein ve mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında aynı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu sonuca dayanarak ellajik asitin nitrozaminlere ve ya anilin gibi toksik maddelere maruz kalındığında CYP2E1'nin metabolizmasını değiştirerek önemli rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

Benzer olarak kinonların detoksifikasyonunda rol oynayan NQO1 enzim aktivitesinde iki kattan fazla artış gözlenmiş olması ellajik asitin pozitif ve iyi etkilerine bir başka artı değer katmaktadır. Ellajik asit karsinojen ajanların etkilerini azaltırken bir diğer yandan da elektrofilik ajanların yıkımını artırarak koruyucu özellikler göstermektedir. Bununla birlikte, NQO1 enziminin tümör baskılayıcı p53 proteininin stabilizasyonunu da artırdığı gerçeği göz önüne alındığında gerçekten önemli derecede antikarsinojen etkiler barındırdığı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca genistein gibi fitokimyasalların NQO1 aktivitesini düşürdüğü gösterilmişken ellajik asitle ilgili çalışma yapılmamıştır [175]. Bu çalışma ile ilk defa ellajik asitin NQO1 aktivitesini artırdığı gösterilmiştir.

NQO1 detoksifikasyon reaksiyonlarından başka nitroaromatik bileşikler gibi çevresel karsinojenlerin ve sigarada bulunan heterosiklik aminlerin aktivasyonunda rol oynadığı gibi antioksidan bir enzim olarak görev yapar. Ubikinonların ve vitamin E'nin antioksidan formlarının oluşumunu sağlar [176] ve antioksidanların indirgenmiş aktif formlarının sürdürülmesine yardım ettiği de düşünülmektedir. Bu enzim yüksek oran da antioksidan koruma gerektiren dokularda fazla miktarda bulunur [177]. CAT ve GPX gibi antioksidan enzimlerde bir artış gözlenmiş olduğu dikkate alındığında bu sonuç bizim verilerimizi doğrulamaktadır. Ellajik asitin kanser metabolizması ve antioksidan kapasitesi üzerine olan etkisi ve şekil 3.32 de gösterilmektedir.



Şekil 3. 32: 30 mg/kg ellajik astin kanser metabolizması ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisi.

Yukarıda bahsedildiği üzere, pek çok doğal kaynaklı ürün, ksenobiyotiklerin (ilaç, çevresel kirlenmeler) metabolizmasında rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak, ilaçlarla eş zamanlı olarak alınan doğal kaynaklı preparatlar, ilaç metabolizmasını etkilemekte, hayati tehlike arz edebilecek beklenmedik farmakolojik etkilerin- düşük ya da yüksek ilaç cevabı, ilaç toksisitesi, ters ilaç etkileşimleri gibi- oluşmasına neden

olabilmektedir. Bu yüzden bu çalışmada ellajik asitin ilaç metabolizması üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sitokrom P4501A2 genellikle reçete edilen ilaçların %10'nun metabolizması ve eliminasyonu ile bağlantılı çok polimorfik bir karaciğer enzimidir. Ayrıca yukarıda bahsedildiği gibi kimyasal toksinlerden karsinojenlerin metabolik aktivasyonunda yer alır. CYP1A2 hem indüklenebilir hem de birçok ilaç ve gıda-ilaç etkileşimleri tarafından inhibe olabilir. CYP1A2 aktivite seviyelerinde farklılık, artmış ya da azalmış kapasite substratların etkileşmesini meydana getirir. CYP1A2'nin bilinen ilaçların yaklaşık %10'nunu katalize ettiği göz önüne alındığında gözlenen düşüş her ne kadar antikanserojenik etkisini ortaya koysa da özellikle bu bitkisel ürünlerin antidepresan grup ilaçlar ile birlikte alınmasının önemli ilaç etkileşimlerine yol açarak doz aşımına ve tehlikeli durumlara neden olabileceği de aşıkardır.

CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer alması nedeni ile de oldukça önem arz eden bir diğer CYP izoformudur. Çeşitli bitkilerin metanolik veya etanolik ekstralarının CYP3A4 aktivitesini modüle ettikleri ve bu bitki bileşenlerinin enzimle etkileştiği gösterilmiştir [178, 179]. Dolayısı ile fitokimyasalların CYP3A4 tarafından metabolize edilen terapötik ajanların etkinliğini azaltarak ya da artırarak etkileme potansiyeline sahip olması ve çok sayıda bileşimin metabolizmasında yer almasından dolayı bu etkileşimlerin tanımlanması son derece önemlidir.

CYP3A4; antibiyotikler (eritromisin), yatıştırıcılar (midazolam), bağışıklık sistemi ayarlayıcıları (siklosporin), anti-viral ilaçlar (ritonavir and saquinavir), anti-histaminler (astemizole), kalsiyum kanal bloklayıcıları (nifedipine and verapamil), HMG KoA redüktaz inhibitörleri (lovastatin), uyarıcılar gibi birçok değişik ilacı metabolize eder [180-185]. Ayrıca bu izozim, testosteron, progesteron, ve androstenedion gibi endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynar [186, 187]. Karaciğerde en fazla bulunan sitokrom P450 olan CYP3A'nın enzim aktivitesinde (ERND) gözlenen azalma yine birçok ilaç metabolizması ile negatif veya pozitif olarak etkileşim gösterecektir. Çünkü bu enzim günümüzde bilenen terapötik etmenlerin yaklaşık yarısının metabolizmasında yer almaktadır.

CYP3A aktivite, protein ve mRNA düzeyleri dikkate alındığında CAR (Temel androstan reseptör) reseptör yolağı ile etkileşim göstermediği ileri sürülebilir ve CAR ligandı barındırmadığının bir delili olarak kabul edilebilir. Dolayısı ile aktivitede gözlenen azalmaların yarışmalı veya yarışmasız mekanizmalı inhibisyon olma olasılığı oldukça yüksektir. Bu noktanın kesin açıklığı kavuşturulması için *in vitro* deneyler yapılması gerekmektedir.

Bununla birlikte kullanılan dozlarda dikkate alındığında ve insanların gıda ile tüketebilecekleri ellajik asit miktarları göz önünde bulundurularak ve ilave olarak CYP3A mRNA ve protein düzeylerinde anlamlı değişimler olmadığı dikkate alındığında ellajik asitin takviye ve alternatif tedavi ajanı olarak kullanıldığı durumlarda ciddi ilaç etkileşimlerinin olmayacağı söylemek yanlış olmayacaktır. Ancak, tedavi amaçlı ve saf etken madde olarak tüketildiği durumlarda mutlaka doktor gözetiminde ve klinik tavsiye ile alınmalıdır.

CYP2C; mevcut klinik kullanımda ilaçların %16'sına etki eder. Bazı antidepresanların, morfin türevlerinin ve özellikle ve ağırlıklı olarak analjezik ilaçların karaciğerde metabolize olmalarında görevli enzimlerden biri olan CYP2C6'nın bağıl APND aktivitesinin azalmış olması bu ilaçların metabolizmasında etkili olduğunun göstergesidir. Bu tarz ilaç kullanan bireylerde bu polifenoli içeren gıdalar alındığında ilaçların metabolizması etkilenmektedir. CYP2C metabolik aktivite bozukluğu, doz ayarlaması güç olan ve toksite meydana getirebilecek (S-varfarin, tolbutamid ve fenitoin gibi) dar terapötik indeksi olan ilaçlar açısından önemlidir. Bu yüzden muhakkak ellajik asit içeren bitkisel ilaçlar kullanılırken doz ayarlaması yapılması gerekmektedir. Literatürde ellajik asitin CYP2C üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu etki, çalışmamızda ilk defa rapor edilmiştir.

CYP2B, önemli farmasötik ajanların metabolizmasına katılması, bazı prokarsinojenlerin nihai karsinojenlere dönüşümünü aktive etmesi ve karaciğerde çeşitli bileşikler ile indüklenebilir olması gibi nedenlerle önemli bir enzim grubudur [188]. CYP2B gen ailesinin birbirinden farklı 17 üyesi bulunmaktadır ve bu üyelerden CYP2B1/2 ve CYP2B9/10 günümüzde en iyi şekilde tanımlanmış, karaciğer ve beyinde fenobarbital ile transkripsiyonel düzeyde aktive olduğu bildirilen izoformlardır [189-191].

CYP2B çeşitli ilaçların metabolizmasına katılmaktadır. Özellikle antineoplastik ilaçların metabolizmasında yer alan CYP2B enzime bağlı aktivitelerin (BPND, EmND, BROD, PROD), protein ve mRNA düzeylerinin baskılanmış olması, bu bitkinin tedavi amaçlı olarak kanser tedavisinde destekleyici ve koruyucu etmen olarak kullanılması bu ilaçların yan etkilerinin abartılı seyretmesine neden olabilir. Bu yüzden ellajik asit içeren bitkisel ürünleri tüm bitkisel tedavilerde olduğu gibi bir doktor gözetimi veya danışmanlığında kullanılmasının zorunlu olduğunu göstermektedir. Böylelikle beklenen etkinin elde edilmesi hem daha olası olacak ve hem de olası yan etkilerin oluşmasını engellemiş olacaktır. Yapılan bir çalışmada sigaranın aktif kanseojen maddesi olan 4-(metilnitrozamin)-1-(3-piridil)-1-bütanon'un (NNK) metabolizmasında ellajik asitin rol oynadığını göstermişlerdir. Ellajik asit NNK metabolizmasındaki N-oksidasyon ve N-hidroksilasyon basamağını inhibe ederek antikanserojenik etki gösterir. Bu hidroksilasyon basamağındaki inhibisyonuda CYP2B ve CYP3A gibi çeşitli CYP izozimleri üzerinden göstermektedir. ellajik asit uygulanmış deneklerde inhibitör etkisi gösterilmiştir [192].

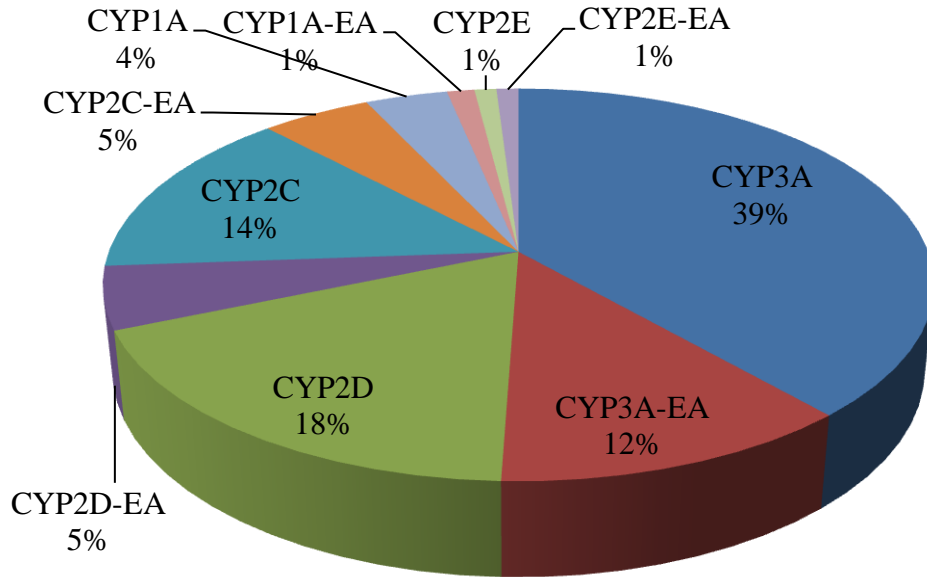
Ellajik asitin özellikle antikanserojenik olarak teşhis edilmesi ve kanser hastaları için alternatif tedavi ajanı olarak kullanıldığı göz önüne alındığında CYP2B etkileşimleri çok büyük önem arz etmektedir. Çünkü kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların büyük bir bölümü toksiktir.

Diğer taraftan, CYP2B1 ve CYP2B2'nin tipik substratı morfin olup, tipik indükleyicisi nikotindir. Ancak bazı bileşiklerin CYP2B izoenzimlerini indükleyici etkisi bölgesel değişkenlik gösterir. Örneğin etanol sıçan karaciğerinde CYP2B1'i indüklerken beyinde indüksiyon yaratmaz ya da nikotin sıçan beyinde indüksiyon yaratırken karaciğerde indüktif etkisi görülmez [193]. Pentoksirezorufin ve benziloksirezorufin, CYP2B1 ve CYP2B2 benzfetamin ve etilmorfin CYP2B9 ve CYP2B10 enzimleri için yüksek seçicilik gösteren bir alkoksirezorufin formudur. Yaptığımız çalışmada ellajik asit, CYP2B izoenzimlerinin çeşitli substratlarında karaciğerde her iki dozda da aynı etkiyi göstermişlerdir. 30mg/kg ellajik asitin ilaç ve steroid metabolizmasına etkisi şekil 3.33 ve 3.34'de gösterilmektedir.

Ayrıca, yaptığımız çalışmalarda ellajik asitin östrojen metabolizmasında yer alan aromataz enzim düzey ve aktivitesinde azalışa neden olması dolayısı ile östrojen

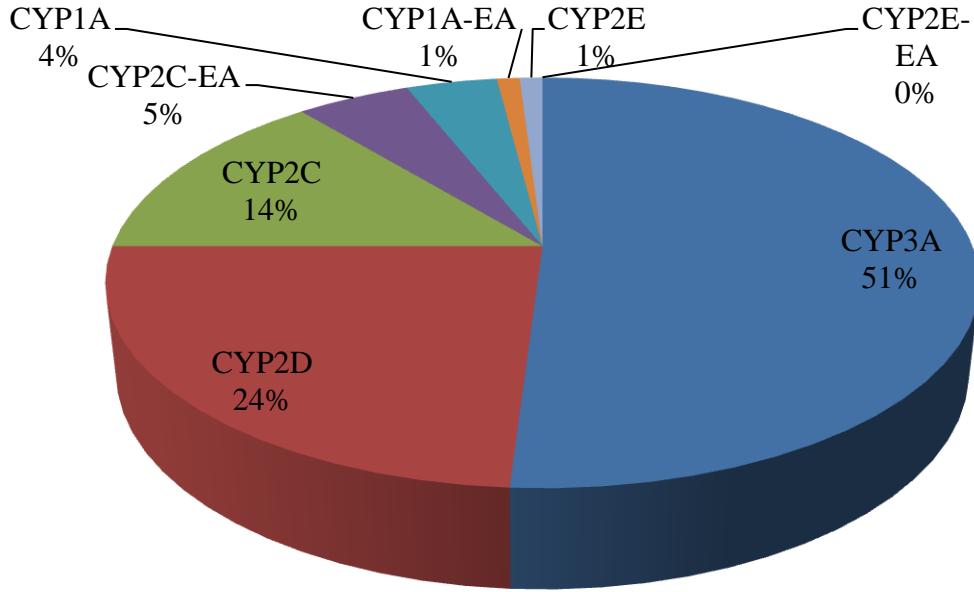
sentezindeki azalma aromataz enzimin yanı sıra steroid ve endojen metabolizmasında rol oynayan CYP2B'nin ve ayrıca CYP3A'nın da östrojen metabolizmasında rol oynayabileceğini düşündürebilir.

Ellajik asidin östrojen reseptör (ER) alt tipleri olan ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$  yoluyla östrojenik/antiöstrojenik aktivitesi olduğu bildirilmektedir [194, 195]. Ellajik asidin, sentetik seçici östrojen reseptör modulatörlerine (SERM) benzer SERM özellikleri gösteren doğal seçici ER ligand olduğu saptamıştır. Çalışmamızda da ellajik asitin östrojen metabolizmasında yer alan aromataz enzim düzey ve aktivitesinde azalışa neden olması, antiöstrojenik etki gösterdiğini açıklamaktadır. Literatürdeki bir çalışmada da ellajik asitin antiöstrojenik etkisini göstermiştir [196]. Bu da bu preparatın özellikle meme kanserli hastaların tedavilerinde etkili olabileceğinin göstergesidir. Yukarıdaki bilgiler ışığında prostat, kolon ve mide kanseri gibi kanserlerde rahatlıkla destekleyici olarak kullanılabilirliği ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.33: İlaç ve steroid metabolizması üzerine 30 mg/kg ellajik asitin protein ekspresyon düzeyine etkisi.





Şekil 3. 34: İlaç ve steroid metabolizması üzerine 30 mg/kg ellajik asitin mRNA ekspresyon düzeyine etkisi.

Diğer fenolik asitlerden farklı olarak ellajik asidin doğrudan enjeksiyon yolunun yanında, oral yoldan gıdalarla verilmesi halinde de antikanserojen etkisi olduğu bildirilmektedir. Ellajik asidin antikanserojen etki mekanizmaları incelendiğinde, intestinal detoksifikasyon enzimleri olarak nitelendirilen Faz II enzimlerini indükledikleri (örneğin glutatyon-S-transferaz enziminin aktivitesini stimüle etmekte ve karaciğerde sentezini arttırmaktadır) ve böylece kanserojen maddenin barsakta emilimini inhibe ettikleri bildirilmektedir [153]. GST multienzim ailesi GSH'ı kullanarak çok sayıda xenobiyotığın detoksifikasyonunda görev alır ve oksidatif strese karşı hücrenin korunmasında önemli role sahiptir. İnsanda 8 farklı gen ailesi tarafından kodlanan çözünebilir (sitozolik) GST'ler tanımlanmıştır.

Total GST düzeylerindeki artış oksidatif strese karşı hücreleri koruduğunun bir göstergesidir. GST-Pi düzeyindeki artış antioksidan etkisinin bir başka göstergesi olarak açıklanabilir. Çeşitli hastalıklarda ve kanser türlerinde artış gösteren GST-Mü aktivitesinde artış olması da pek anlaşılır bir etki değildir. Literatürdeki bazı çalışmalarda ellajik asitin GST düzeylerinde azalışa neden olduğu gösterilirken [197] bazı çalışmalarda da artışa neden olduğunu gösterilmiştir [198]. Literatürdeki çalışmaların farklılık göstermesi kullanılan doz ile alakalıdır. Yaptığımız çalışmada 10 mg/kg ellajik asit GST düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, 30 mg/kg ellajik asit GST düzeylerinde artışa neden olmaktadır.

Şu ana kadar çalışılan iki normal ve iki kanser hücre hattında EAT'nin çeşitli konsantrasyonunda sitotoksik etki gözlenmiştir. Bu sitotoksik etkiyi hangi yolağı kullanarak gösterdiğini anlamak ve tümör baskılayıcı genler üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını anlamak için PTEN ve p53 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

p53 birçok organizmada kanserin baskılanmasında rolü olan çok önemli bir proteindir. Hücre büyümesinin durdurulması, programlanmış hücre ölümü, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında da rol alır. Genel olarak normal hücrelerde p53 inaktiftir. Hücre herhangi bir strese maruz kaldığı durumlarda DNA hasarı olursa, hücre bu uyarıya p53 düzeyini artırarak yanıt verir. p53 tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu kanser hücreleri olan MCF7 ve PC14 hücrelerinde ve normal hücre hattı olan NIH293 hücre hattında herhangi bir değişikliğe neden olmazken, kanser olmayan 3T3 hücresinde p53 ekspresyonu üzerinde azalmaya neden olmuştur. Fakat bu azalış anlamlı değildir. Literatürdeki çalışmalarda ellajik asitin hücrelerde p53 ekspresyon düzeyini değiştirerek antikanserojenik etki gösterdiği gösterilmiştir [199, 200]. Fakat bir çalışmada da ellajik asit uygulanan boyun kanseri hücrelerinde p53 ekspresyonun değişmediği gözlenmiştir [201]. Bizim yaptığımız çalışmada herhangi bir değişiklik görülmemiş olması kullanılan dozla ilgili ya da hücre hattı ile ilgili olabilir.

Tümör baskılayıcı genler kanser gelişimini baskılar. Sitotoksik etki gözlenen dozlarda tümör baskılayıcı genler üzerinde çalışmalar sonucunda açıkça görüldüğü gibi PTEN tümör baskılayıcı geninin ekspresyonunu ellajik asit konsantrasyona bağlı olarak kontrole oranla PC14 akciğer kanser hücrelerinde ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ekspresyonlarını azalırken, kanser olmayan fibroblastik hücre dizisi olan 3T3 ve insan böbrek hücre dizisi 293 hücrelerinde değişikliğe neden olmamaktadır. Literatürde ellajik asitin pTEN geni üzerine etkisi çalışılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada ellajik asitin kanser ve ilaç metabolizması üzerine olan etkileri çalışılmıştır. Fakat görülen sonuçların ellajik asitin kendisinin mi yoksa metabolitinin mi gösterdiği bilinmemektedir. Ellajik asit türevlerinin ve ellajitanenlerin biyoyararlanımı hakkında çok az şey bilinmektedir [202]. Barsak mikroflorasının, suda az çözünen ellajik asidi urolithin adı verilen bileşiklere metabolize ettiği ileri sürülmektedir. Ellajitanenin daha fazla çözünür olması

nedeniyle, ellajitanenlerin absorpsiyonu veya türevlerine dönüşümü kolay olmaktadır ve barsaklarda bulunan enzimler ellajitanenlerin hidrolizasyonunu sağlayarak ellajik asit birimlerinin oluşmasına neden olmaktadır [203, 204]. Barsak mikroflora metabolitlerinin, ellajitanen ve ellajik asit türevlerinin miktarını sıçan üresinde, plazmasında ve dışkısında belirlemişlerdir. Asıl etkinin ellajik asitin metaboliti olan urolithinden kaynaklandığı söylenmektedir. Fakat yeteri kadar kaynak bulunmamaktadır [205].

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada ellajik asitin ilaçlar ve karsinojenler gibi birçok ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alan P450 izozimlerine, antioksidan mekanizmasına ve tümör baskılayıcı genler üzerine olan etkisi belirlenmiştir. Ellajik asitin NQO1, CYP2C ve pTEN geni üzerine olan etkileri ilk kez rapor edilmiştir. Ellajik asitin ilaçları ve diğer ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler üzerine etkisi göz önünde bulundurulduğunda bu maddenin antikanserojenik, antioksidatif, antiöstrojenik özellikleri önem arz etmektedir ve birçok açıdan önemli bir koruyucu olduğu ortaya çıkmaktadır.

Elde edilen bulgular, ellajik asitin kanser dâhil çeşitli hastalıklar için kullanılabilir çok önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni veya alternatif koruyucu ve/veya destek etmeni olduğunu göstermektedir. Bu kadar pozitif ve iyi etkiyi bünyesinde barındıran önemli bir bileşik olduğu muhakkaktır. Ancak, bireysel doz ayarlaması yapılması da şarttır. Bu sayede ellajik asitin insanlarda sebep olabileceği organ toksisitesi engellenebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Blumenthal, M.** (1999). Herb market levels after five years of boom, *Herbal Gram.* **47**, 64-65.
- [2] **Gruenwald, J.** (2000). The supplement markets in the US and Europe, *Neutrachem. World*, **36-37**.
- [3] **Thomas, K.J., Nicholl, J.P., Coleman, P.,** (2001). Use and expenditure on complementary medicine in England; a population based survey. *Complementary Therapies in Medicine.* **9**, 2-11.
- [4] **Zhou, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A., Paxton, J.W.** (2003). Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab. Rev.* **35**, 35-98.
- [5] **Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J.** (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences.* **74**, 935-968.
- [6] **Crone, C. C., Wise, T. N.** (1997). Survey of alternative medicine use among organ transplant patients, *J. Transplant. Coord.* **7**, 123-130.
- [7] **Liu, E.H., Turner, L.M., Lin, S.X., Klaus, L., Choi, L.Y., Whitworth, H., Ting, W., Oz, M.C.** (2000). Use of alternative medicine by patients undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **120(2)**, 335-41.
- [8] **Fugh-Berman, A., Ernst, E.** (2001). Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **52**, 587-595.
- [9] **Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O.** (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science.* **22**, 400-402.
- [10] **Adalı, O., AbuBaker, T., Arınc, E.** (1996). Immunological and sub-structural characterization of sheep lung microsomal cytochrome P450LgM2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 363-372.
- [11] **Arınc, E., Adalı, O., İscan, M., Güray, T.** (1991). Stimulatory effects of benzene on rabbit liver and kidney microsomal cytochrome P-450 dependent drug metabolizing enzymes. *Arch of Toxicol.* **65**, 186-190
- [12] **Arınc E., Adali, O., Gençler-Özkan, A.M.** (2000). Induction of N-nitrosodimethylamine metabolism in liver and lung by in vivo pyridine treatment of rabbits. *Arch of Toxicol.* **74**, 329-334.
- [13] **Arınc, E., Arslan, Ş., Bozcaarmutlu, A., Adalı O.** (2007). Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem Toxicol.* **45**, 107-118.
- [14] **Şen, A., Arınc, E.** (2000). Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver (*Liza saliens*) microsomes. *Comp. Biochem. Physiol.* **126C**, 235-244.

- [15] **Şen, A., Hu, C.-H., Urbach, E., Wang-Buhler, J.-L., Yang, Y.-H., Arınc, E., Buhler, D. R.** (2001). Cloning, sequencing and characterization of CYP1A1 cDNA from leaping mullet (*Liza saliens*) liver and implications for the potential functions of its conserved amino acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **15**, 243-255
- [16] **Orellana, M., Guajardo, V., Araya, L., Rodrigo, T.** (2001). Oxidative stress, microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in the liver of rats treated with acetone. *Comp. Biochem. Physiol.* **128**, 503-509.
- [17] **Yamaori, S., Yamazaki, H., Iwano, S., Kiyotani, K., Matsumura, K., Honda, G., Nakagawa, K., Ishizaki, T., Kamataki, T.** (2004). CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet.* **19**, 120-129.
- [18] **James, M.O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M.C.** (2005). Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. *Aquat Toxicol.* **72**, 361-371.
- [19] **Semiz A., Şen A.** (2007). Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (bitter melon) fruit extract. *African Journal of Biotechnology.* **6**, 273-277.
- [20] **Şen A., Semiz, A.** (2007) Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (*Liza saliens*). *Ecotoxicology Environmental Safety.* **68(3)**, 405-411.
- [21] **Ozkarsli M., Sevim H., Şen A.** (2008). In vivo effects of *Urtica urens* on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats. *Xenobiotica.* **38**, 48-61.
- [22] **Lu, A.Y.H. and Lewin, W.** (1974). The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. *Biochem. Biophys. Acta.* **344**, 205-240.
- [23] **Arınc, E., Philpot, R.M.** (1976). Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *J. Biol. Chem.* **251**, 3213-3220.
- [24] **Nebert, D.W., Gonzalez, F.J.** (1987). P-450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 945-993.
- [25] **Okita R.T., Masters B.S.S.** (1997). Biotransformation: The Cytochromes P450 in: Textbook of Biochemistry with clinical correlations (edited by Devlin T.M. A John Wiley and Sons INC., Publications, New York), **982-998**.
- [26] **Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C, Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P.** (1999). Human cytochromes P450. *Mol. Aspect of Med.* **20**, 1-137.
- [27] **Oleksiak, M.F., Wu,S., Parker, C., Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., Stegeman, J. J.** (2002). Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **411**, 223-234.
- [28] **Nebbia, C., Dacasto, M., Carletti, M.** (2003). Postnatal development of hepatic oxidative, hydrolytic and conjugative drug-metabolizing enzymes in female horses. *Life Sci.* **74**, 1605-1619.
- [29] <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>

- [30] **Bühler, D.R., and Wang-Buhler, J.L.** (1998). Rainbow trout cytochrome p450s: purification, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* **121C**, 107-137.
- [31] **Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R.** (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*. **6**, 1-13.
- [32] **Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujikuriyama, Y., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J.** (1991). The p450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10**, 1-14.
- [33] **Nelson, D.R.** (2003). Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate p450 evolution. *Arch. Biochem. Biophys.* **409(1)**, 18-24.
- [34] **Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.** (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics*. **6**, 1-43.
- [35] **Evans W.E., Relling M.V.** (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. **286(5439)**, 487-91.
- [36] **McLemore, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahan, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., Eggleston, J.C., Boyd, M.R., Hines, R.N.** (1990). Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1333-1339.
- [37] **Smith, T.J., Guo, Z., Guengerich, F.P., Yang, C.S.** (1996). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*. **17**, 809-813.
- [38] **Conney, A.H.** (2003). Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**, 1-30.
- [39] **Chen, C., Kong, A.N.** (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med.* **36**, 1505-1516.
- [40] **Sivaraman, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L.** (1994). CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* **54**, 3692-3695.
- [41] **Jefcoate, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L.** (2000). Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **95-112**.
- [42] **Ciolino, H.P., Wang, T.T., Yeh, G.C.** (1998). Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* **58**, 2754-2760.

- [43] **Ciolino, H.P., Yeh, G.C.** (1999). The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br. J. Cancer.* **79**, 1340-1346.
- [44] **Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R.** (2000). In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica.* **30**, 35-251.
- [45] **Machala, M., Kubinova, R., Horavova, P., Suchy, V.** (2001). Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother. Res.* **15**, 114-118.
- [46] **Chan, H.Y., Chen, Z.Y., Tsang, D.S., Leung, L.K.** (2002). Baicalein inhibits DMBA-DNA adduct formation by modulating CYP1A1 and CYP1B1 activities. *Biomed. Pharmacother.* **56**, 269-275.
- [47] **Wang, H., Wang, Y., Chen, Z.Y., Chan, F.L., Leung, L.K.** (2005). Hydroxychalcones exhibit differential effects on XRE transactivation. *Toxicology.* **207**, 303-313.
- [48] **Wen, X., Walle, U.K., Walle, T.** (2005). 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis.* **26**, 803-809.
- [49] **Apostolides, Z., Balentine, D.A., Harbowy, M.E., Hara, Y., Weisburger, J.H.** (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutat. Res.* **389**,167-172.
- [50] **Shukla, Y., Taneja, P.** (2002). Anticarcinogenic effect of black tea on pulmonary tumors in Swiss albino mice. *Cancer Lett.* **176**, 137-141
- [51] **Catterall, F., McArdle, N.J., Mitchell, L., Papayanni, A., Clifford, M.N., Ioannides, C.** (2003). Hepatic and intestinal cytochrome P450 and conjugase activities in rats treated with black tea theafulvins and theaflavins. *Food Chem. Toxicol.* **41**,1141-1147.
- [52] **Szaefer H, Jodynis-Liebert J, Cichocki M, Matuszewska A, Baer-Dubowska W.** (2003).Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine. *Toxicology* **186(1-2)**, 67-77.
- [53] **Mekjaruskul C., Jay M., Sripanidkulchai B.** (2012). Modulatory effects of *Kaempferia parviflora* extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J Ethnopharmacol.* [Epub ahead of print]
- [54] **Harris JW., Rahmana K. B., Guenger C.H., Collinsm J.M.** (1994) Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res.* **54**, 4026-4035.
- [55] **Sonnichsen D.S., Lie O., Schuetz E.G., Schuetz J.D., Pappo A. & Relling M.V.** (1995) Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 566-575.
- [56] **Leo M.A., Lasker J.M., Raucy J.L., Kim C.I., Black M. & Lieber C.S.** (1989). Metabolism of retinol and retinoic acids by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 305-312.
- [57] **Obach, R.S.** (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 88-95.



- [58] **Bray, B.J., Perry, N.B., Menkes, D.B., Rosengren, R.J.** (2002). St. John's Wort Extract Induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster Mouse. *Toxicol. Sci.* **66**, 27-33.
- [59] **Miller, W.R., Anderson, T.J., Jack, W.J.** (1990). Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **37**, 1055-1059.
- [60] **Zhou, C., Zhou, D., Esteban, J., Murai, J., Siiteri, P.K., Wilczynski, S., Chen, S.** (1996). Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **59**, 163-171.
- [61] **Kumar, N., Allen, K., Riccardi, D., Kazi, A., Heine, J.** (2004). Isoflavones in breast cancer chemoprevention: where do we go from here? *Front Biosci.* **9**, 2927-2934.
- [62] **Hayes, J.D., Mantle, T.J.** (1986). Use of immunoblot techniques to discriminate between the glutathione s-transferase yf, yk, yg, yn/yb and yc subunits and to study their distribution in extra-hepatic tissues. *Biochem. J.* **233**, 779-788.
- [63] **Hayes, J.D., Pulford, D.J.** (1995). The glutathione s-transferase supergene family: regulation of *gst* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **6**, 445-600.
- [64] **Mosialou, E., Ekstrom, G., Adang, A.E.P., Morgenstera, R.** (1993). Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1645-1651.
- [65] **Bulavin, D.V., Korpishchenko, A.I., Gubanov, A.L., Rechetov, A.V.** (1996). Glutathione s-transferase pl-1 in normal and cancerous lung tissue: properties, function, and possible mechanisms for regulating activity. *Biokhimiia.* **61**, 1015-1027.
- [66] **Peters, W.H., Roelofs, H.M., Hectors, M.P., Nagengast, F.M., Jansen, J.B.** (1993). Glutathione and glutathione S-transferases in Barrett's epithelium. *Br. J. Cancer.* **67**, 1413-1417.
- [67] **Kang, K.W., Park, E.Y., Kim, S.G.** (2003). Activation of CCAAT/enhancer-binding protein beta by 2'-O-methyl-3'-O-methoxyflavone (PD98059) leads to the induction of glutathione S-transferase A2. *Carcinogenesis.* **24**, 475-482.
- [68] **Ernster, L., Ljunggren, M., Danielson, L.** (1980). Transfer of phospholipids between the endoplasmic reticulum and mitochondria in rat hepatocytes *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**: 88-92.
- [69] **Estabrook, R.W.** (1996). The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB J.* **10**, 202-204.
- [70] **Ernster, L.** (1967). DT-diaphorase *Methods Enzymol.* **10**, 309-317.
- [71] **Mayers PA.** (1993). Pentoz Fosfat Yolu ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları. *Harper'in Biyokimyası*. Barış Kitabevi. İstanbul. **237-248**
- [72] **Akkuş İ.** (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya 1. *Baskı Mimoza Yayınları*, **17**.
- [73] **Machado-Silva A., Perrier, S., Bourdon, J.C.** (2010). p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol.* **57-62**. Epub.

- [74] **Xu, X.B., Tian, S.P., Yao, H.J., Deng, X., Qin, G.Z., Chan, Z.L.** (2007). Characterization and Expression of beta-1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. **97(3)**, 260-8
- [75] **King, A. and Young, G.** (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet Assoc.*, **99**, 213-218.
- [76] **Karadeniz, F. ve Ekşi, A.** (2001). Elma suyunda fenolik madde dağılımı üzerine araştırma. *Tarım Bilimleri Dergisi*. **7(3)**, 135-141.
- [77] **Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E.** (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems: A review. *Biochem. Eng. J.*, **14**, 217-225.
- [78] **Christophoridou S, Dais P.** (2009) Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chim Acta*. **9**, 633(2):283-92.
- [79] **Baydar, N.,** (2006). Phenolic Composition of Grapevine Shoot Tips Collected in Different Months and Their Effects on the Explant Browning. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. **20(1)**, 41-46.
- [80] **Nilüfer D., Boyacıoğlu D.** (2008). Soya ve Soya Ürünlerinin Fonksiyonel Bileşenleri. *Gıda*, **33(5)**, 241-250.
- [81] **Bostan, S. Z.; Kan, T.,** (2010). Determination of Pomological Characteristics of Organic and Conventional Apricot Cultivars (*Prunus armeniaca* L.). *International Conference on Organic Agriculture in Scope of Environmental Problems*. 03-07 February 2010, Famagusta, Cyprus Island. Book of Proceedings, **309-312**.
- [82] **Williams, R.J., Spencer J.P.E., Rice-Evans C.** (2010). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, **838-841**.
- [83] **Galati E.M., Monforte M.T., Tripodo M.M., Trovato A.** (2000). Antiinflammatory activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. cladodes. *X Congresso SIPHAR*, Assisi (Italy), Abstracts, **13**.
- [84] **Sahu S.C., Gray C.** (1994). Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Letters*, Pages **159-164**.
- [85] **Canivenc-Lavier M.C., Vernevaut M.F., Totis M., Siess M.H., Magdalou J., Suschetet M.** (1996). Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*; **114**, 19-27.
- [86] **Ciolino H.P. and Yeh G.C.** (1999) Inhibition of Aryl Hydrocarbon-Induced Cytochrome P-450 1A1 Enzyme Activity and *CYP1A1* Expression by Resveratrol. *Molecular Pharmacology*, **56**, 760-767.
- [87] **Doostdar H., Burke M.D. and Mayer R.T.** (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**, 31-38.
- [88] **Hodek P., Trefil P., Stiborova M.,** (2002). Flavonoids - Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochrome P450. *Chemico-Biol. Intern.* **139(1)**, 1-21.
- [89] **Lin J.H., Lu A.Y.H.** (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **35**, 361-390.

- [90] **Kohn M.C., Walker N.J., Kim A.H., Portier C.J.** (2001). Physiological modeling of a proposed mechanism of enzyme induction by TCDD. *Toxicology*. **162(3)**, 193–208.
- [91] **Bu-Abbas, A., Dobrota, M., Copeland, E., Clifford, M.N, Walker, R., Ioannides, C.** (1999). Proliferation of hepatic peroxisomes in rats following the intake of green or black tea. *Toxicology Letters*, Pages **69–76**.
- [92] **Maliakal, P.P., Coville, P.F., Wanwimolruk, S.** (2010). Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **569–577**.
- [93] **Robbins, R.J.** (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(10)**, 2866–2887.
- [94] **Heur, Y.H., Zeng, W., Stoner, G.D., Nemeth, G.A. and Hiton, B.** (1992). Synthesis of ellagic acid o-alkyl derivatives and isolation of ellagic acid as a tetrahexanoyl derivative from *Fragaria ananassa*. *Journal of Natural Products*, **55(10)**, 1402-1407.
- [95] **Dagbagh, S.,** (2001). Mese palamutundan elde edilen tanenin sarapta durultma maddesi olarak kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Manisa, **89s**.
- [96] **Lei, Z.,** (2002). Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum, Doctor of Philosophy Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia, **158**.
- [97] **Lee, J.,** (2004). Hydrolytic and antioxidant properties of ellagic acid and its precursors present in muscadine grape, Doctor of Philosophy Thesis, University of Florida. Florida, **104s**.
- [98] **Pari L, Sivasankari R.** (2008). Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced-oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol* **22**, 395–401.
- [99] **Häkkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Mykkanen, H. M., Heinonen, I. M., Törrönen, A.R.,** (2000). Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage, *European Food Research and Technology*, **212**, 75-80.
- [100] **Seeram N.P., Henning S.M., Zhang Y., Suchard M., Li Z., Heber D.** (2006). Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J.Nutr.*; **136**, 2481-2485.
- [101] **Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N.V.R.,** (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40**, 206-210.
- [102] **Okeke, J.C.,** (2006). The Effects of ellagic acid on insulin-like growth factor binding protein-2 in human prostate cancer cells, Master of Science Thesis, Bowling Green State University, **66**.
- [103] **Hurley, R.E.,** (1998). Interactions of N-methyl-N-nitrosourea and ellagic acid in developmental toxicology, Doctor of Philosophy Thesis, Colorado State University. Colorado, **156s**.
- [104] **Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Faveal-Torres, E., Aguilar, C. N.** (2007). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins, *Applied Microbiology Biotechnology*, **1-11**.

- [105] **Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D.** (2006). Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J.Nutr*; **136**: 2481-2485.
- [106] **Cerda, B., Espin, C.J., Para, S., Martinez, P., Tomas-Barberan, F. A.** (2004). The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6hdibenzopyran- 6- one derivatives by the colonic microflora of healthy humans, *European Journal of Nutrition*, **43**, 205-220.
- [107] **Seeram, N.P., Lee, R., Heber, D.** (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, *Clinica. Chimica. Acta*, **348**, 63-68.
- [108] **Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C.** (2006). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1611-1620.
- [109] **Papoutsi, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P., Moutsatsou, P.** (2005). Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic aci via the estrogen receptor subtypes ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7715-7720.
- [110] **Loarca-Pina, G., Kuzmicky, P.A., Gonzalez de Mejia, E., Kado, N.Y.** (1998). Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin b1 in the *Salmonella* microsuspension assay, *Mutation Research*, **398**, 183-187.
- [111] **Vattern, D.A., Lin, Y.T., Labbe, R.G., Shetty, K.** (2004). Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*, *Process Biochemistry*, **39**,1939-1946.
- [112] **Huetz, P., Mavaddat, N., Mavri, J.** (2005). Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **45**, 1564-1570.
- [113] **Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E. N.** (1997). Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quersetin, and ellagic acid on human ldl oxidation, *Food Chemistry*, **61**, 71-75.
- [114] **Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R.,Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B.** (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stres, atherogenic modifications to ldl, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice, *American Journal of Clinical Nutrition*.**71**, 1062-1076.
- [115] **Gil, M. I., Holcroft, M. D., Kader, A. A.** (1997). Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1662-1667.
- [116] **Priyadarsini, K. I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H.** (2002). Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2200-2206.

- [117] **Gil, M. I., Holcroft, M. D., Kader, A. A.** (1997). Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1662-1667.
- [118] **Schenkman, L. B., Cinti, D. L.** (1978). Preparation of microsomes with calcium. *Methods in Enzymology*. **52**, 83-89.
- [119] **Sen, A., Kirikbakan, A.** (2004). Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry (Mosc)*. **69(9)**, 993-1000.
- [120] **Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- [121] **Imai, Y., Ito, A., Sato, R.** (1966). Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* **60**, n417-428.
- [122] **Cochin, J., Axelrod, J.** (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **125**, 105-110.
- [123] **Nash, T.** (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 416-421.
- [124] **Burke M.D, Mayer R. T.** (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially induced by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos.* **2**, 583-588.
- [125] **Arinc, E., Sen, A.** (1994). Effects of *in vivo* benzo(a)pyrene treatment on liver microsomal mixed-function oxidase activities of gilthead. *Comp. Biochem. Physiol.* **107C**, 404-414.
- [126] **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W. B.** (1974). Glutathione S-transferases. the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol.Chem.* **249**, 7130-7139.
- [127] **Sen, A., Kirikbakan, A.** (2004). Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry (Mosc)*. **69(9)**, 993-1000.
- [128] **Ernster, L., Ljunggren, M. and Danielson, L.** (1960). *Biochem. Biophys.Res.Commun.* **2**, 88.
- [129] **Abei, H.** (1974). Catalase. Method of enzymatic analysis. New York: *Academic Press*; pp. **673-84**.
- [130] **Paglia, E.D., Valentine W.N.** (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* **70**, 156-9.
- [131] **Reitman, S., Frankel, S.** (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* **28(1)**, 56-63.
- [132] **Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-684.
- [133] **Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels. a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**, 203-209.
- [134] **Tovey, E. R., Baldo, B. A.** (1987). Comparison of semidry and conventional tank buffer electrotransfer of proteins from

- polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis*. **8**, 384-387.
- [135] **Morse Jv I.A. and Stoner, G.D.** (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, **14**, 1737—1746.
- [136] **Giuliano AR, Gapstur S.** (1998). Can Cervical Dysplasia and Cs Nutrients? *Nutrion Rewievs*. DOI: **1753-4887**.
- [137] **Chao C.Y., Mong M.C., Chan K.C., Yin M.C.** (2010). Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol Nutr Food Res*. **54(3)**, 388-95.
- [138] **Chao, P., C., Hsu, C.C., Yin, M.C.** (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)*. **14**; 6:33.
- [139] **Bhosle, S.M., Huilgol, N.G., Mishra, K.P.** (2005). Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid. *Clin Chim Acta*. **359(1-2)**, 89-100.
- [140] **Pari L., Sivasankari R.** (2008) Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam Clin Pharmacol*. **22(4)**, 395-401.
- [141] **Devipriya, N., Sudheer, A.R., Vishwanathan, P., Menon, V.P.** (2008) Modulatory potential of ellagic acid, a natural plant polyphenol on altered lipid profile and lipid peroxidation status during alcohol-induced toxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* Volume 22, Issue 2, pages **101–112**.
- [142] **Girish, C., Koner, BC, Jayanthi S, Ramachandra Rao K, Rajesh B, Pradhan SC.** (2009) Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol*. **23(6)**, 735-45.
- [143] **Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S. Van de Put, F., Dacombe, C. and Rice-Evans, C.**(2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicals Res*. **36**, 217-233.
- [144] **Burak, M., Çimen, Y.,** (1999). Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *T. Klin. Tıp Bilimleri*, **19**, 296-304.
- [145] **Ekşi, A., Özhamamcı, İ.,** (2009). Chemical composition and guide values of pomegranate juice. *Gıda*, **34 (5)**, 265-270
- [146] **Hannum, S.M.,** (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 1-17.
- [147] **Aqil, F., Gupta, A., Munagala, R., Jeyabalan, J., Kausar, H., Sharma, R.J., Singh, I.P., Gupta, R.C.** (2012). Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutr Cancer*. **64(3)**, 428-38: 10.108
- [148] **Sajid, Z.I., Anwar, F., Shabir, G., Rasul, G., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H.** (2012) Antioxidant, antimicrobial properties and phenolics of different solvent extracts from bark, leaves and seeds of *Pongamia pinnata* (L.) *Pierre. Molecules*, **17(4)**, 3917-32.
- [149] **da Silva A.R., de Morais S.M., Mendes Marques M.M., de Oliveira D.F., Barros C.C., de Almeida. R.R., Vieira, I.G., Guedes, M.I.**

- (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two Spondias species from Northeastern Brazil. *Pharm Biol.* **50**(6), 740-6.
- [150] **Gülçin, I., Topal, F., Çakmakçı, R., Bilsel, M., Gören, A.C., Erdogan, U.** (2011). Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *J Food Sci.* **76**(4), C585-93.
- [151] **Kähkönen M, Kylli P, Ollilainen V, Salminen JP, Heinonen M.** Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudbberries (2011). *J Agric Food Chem.* **8**, 60(5):1167-74.
- [152] **Waladkhani, A.R., Clemens, M.R.,** (2001), Effect of dietary phytochemicals on cancer development, Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion, Chapter 1, *CRC Pres*, **17p**.
- [153] **Watzl, B., Leitzmann, C.,** (2005). Bioaktive substanzen in lebensmitteln. *Hippokrates*, **254s**.
- [154] **Zhou, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A. and Paxton, J.W.** (2003) Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab Rev* **35**, 35–98.
- [155] **Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y. et al** (2004) Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci* **74**, 935–968.
- [156] **McLemore, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeg, R., Lubert, R.A., Eggleston, J.C., Boyd, M.R. and Hines, R.N.** (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: Evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1333–1339.
- [157] **Sivaraman, L., Leatham, M.P., Yee, J., et al** (1994). CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res*, **54**, 3692-5.
- [158] **Jefcoate, C.J., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner S.J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G. and Berstein, L.** (2000). Tissue-Specific Synthesis and Oxidative Metabolism of Estrogens. *Natl Cancer Inst Monogr* (**27**), 95-112.
- [159] **Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Wang, T.T., Yeh, G.C.** (1998). Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*
- [160] **Ciolino, H.P. and Yeh, G.C.** (1999). Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. Ciolino, H.P., Yeh, G.C. *Mol. Pharmacol.*
- [161] **Barch, D.H., Rundhaugen, L.M., Thomas, P.E., Kardos, P.** (1994). Dietary ellagic acid inhibits the enzymatic activity of CYP1A1 without altering hepatic concentrations of CYP1A1 or CYP1A1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **201**, pp. 1477–1482.
- [162] **Adamson, R.H., Thorgeirsson, U.P., Sugimura, T.** (1996). Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. *Arch Toxicol Suppl*; **18**, 303-318.
- [163] **Hümmerich, J., Zohm, C., Pfau, W.** (2004). Modulation of cytochrome P450 1A1 by foodderived heterocyclic aromatic amines. *Toxicology*; **199**, 231-240.

- [164] **Kim, D., Guengerich, F.P.** (2005). Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; **45**, 27-49.
- [165] **Ma, Q., Lu, A.Y.** (2007). CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*; **35**, 1009-1016.
- [166] **Apostolides, Z., Balentine, D.A., Harbowy, M.E., Hara, Y., Weisburger, J.H.** (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutat. Res.*, **389**, pp. 167–172.
- [167] **Shukla, Y., and Taneja, P.**, (2002) Anticarcinogenic effect of black tea on pulmonary tumors in Swiss albino mice. *Cancer Lett.*, **176**, pp. 137–141
- [168] **Catterall, F., McArdle, N.J., Mitchell, L., Papayanni, A., Clifford, M.N., Ioannides, C.** (2003). Hepatic and intestinal cytochrome P450 and conjugase activities in rats treated with black tea theafulvins and theaflavins. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, pp. 1141–1147.
- [169] **Wilson, T., Lewis, M.J., Cha, K.L., Gold, B.** (1992). The effect of ellagic acid on xenobiotic metabolism by cytochrome P-450IIE1 and nitrosodimethylamine mutagenicity. *Cancer Lett.*; **10**, 61(2):129-34.
- [170] **Yoo, J.S., Guengerich, F.P., Yang, C.S.** (1988). Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res*; **88**, 1499-1504.
- [171] **Guengerich, F.P., Kim, D.H., Iwasaki, M.** (1991). Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*; **4**, 168-179.
- [172] **Mehlman M.A.** (1991). Dangerous properties of petroleum refining products: benzenehealth effects. *Ramazzini Newsletter*; **3**, 16-20.
- [173] **Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E., Park, S.S., Gelboin, H.V., Vamio, H.**(1992). A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol*; **43**, 251-257.
- [174] **Yamazaki, H., Oda, Y., Funae, Y., Imaoka, S., Inui, Y., Guengerich, F.P. Shimada, T.**(1992). Participation of rat liver cytochrome P4502E1 in the activation of Nnitrosodimethylamine and N nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase overexpressing Salmonella typhimurium strain. *Carcinogenesis*; **13**, 979-985.
- [175] **Wiegand, H., Boesch-Saadatmandi, C., Regos, I., Treutter, D. et al.** (2009). Effects of Quercetin and Catechin on Hepatic Glutathione-S Transferase (GST), NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1(NQO1), and Antioxidant Enzyme Activity Levels in Rats. *Nutrition and Cancer*; **61(5)**, 717–722.
- [176] **Sarbia, M., Bitzer, M., Siegel, D. Ross, D., Schulz, W.A., Zotz, R.B., Kiel, S., Geddert, H., Kandemir, Y., Walter A, Willers, R., Gabbert, H.E.** (2003). Association between NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer.*; **107(3)**, 381-6.
- [177] **Siegel, D., Ross, D.** (2000) Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO1) in human tissues.*Free Radic Biol Med.*;(3-4), 246-53.



- [178] **Obach, R.S.** (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 88–95.
- [179] **Bray, B. J., Perry, N. B, Menkes, D. B, Rosengren, R. J.** (2002). St. John's wort extract induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster mouse. *Toxicol Sci.*; **66(1)**, 27–33.
- [180] **Martin, J., Krum, H.** (2003) Cytochrome P450 Drug Interactions Within The HMG-KoA Reductase Inhibitor Class: Are They Clinicaly Relevant. *Drug Safety*, Volume 26, Number 1, pp. **13-21(9)**
- [181] **Arayne, M.S., Sultana, N., Bibi, Z.** (2005) Grape Fruit Juice- Drug Interactions. *Pak J Pharm Sci.***18(4)**, 45-57.
- [182] **van Herwaarden, A.E., Smit, J.W., Sparidans, R.W., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C.M., Schellens, J.H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H.** (2005) Midazolam and cyclosporin a metabolism in transgenic mice with liver-specific expression of human CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 892-895.
- [183] **Sica, D.A.** (2006) Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. *Am. J. Hypertens.* **19**, 768-773.
- [184] **Sugimoto, K., Araki, N., Ohmori, M., Harada, K., Cui, Y., Tsuruoka, S., Kawaguchi, A., Fujimura, A.** (2006) Interaction between grapefruit juice and hypnotic drugs: comparison of triazolam and quazepam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **62**, 209-215
- [185] **Klotz, U.** (2007) Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin. Pharmacokinet.* **46**, 985-996.
- [186] **Yamazaki, H., Shimada, T.** (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 161-169.
- [187] **Wang, H., Napoli, K.L., Strobel, H.W.** (2000) Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones. *Mol. Cell. Biochem.* **213**, 127-135.
- [188] **Hedlund, E., Gustafsson, J.A., Warner, M.** (1988). Cytochrome P450 in the brain: 2B or not 2B, Trends. *Pharmacol. Sci.*,**19**, 82-85.
- [189] **Omicinski, C.J., Rimmel, R.P., Hosagrahara, V.P.,** (1999). Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology, *Toxicol. Sci.*, **48**, 151-156.
- [190] **Giachelli, C.M., Lin-Jones, J., Omiecinski, C.J.,** (1989). Isolation and characterization of rat cytochrome P-450IIB gene family members, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7046-7053.
- [191] **Özerol E.** (1996). Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center.*
- [192] **Zhang, Z., Hamilton, S.M., Stewart, C., Strother, A,** (1993). Teel Inhibition of liver microsomal cytochrome P450 activity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK by capsaicin and ellagic acid. *Anticancer Res.*,**13**, pp. 2341–2346
- [193] **Miksys, S.L., Tyndale, R.F.,** (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain, *J. Psychiatr. Neurosci.*, **27**, 406-415.
- [194] **Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C.,** (2006), Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic

- and antiestrogenic activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1611-1620.
- [195] **Papoutsis, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P., Moutsatsou, P.**, (2005), Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7715-7720
- [196] **Adams, L.S., Zhang, Y., Seeram, N.P., Heber, D., Chen, S.** (2010). Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)*.; **3(1)**, 108-13.
- [197] **Hayashi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V., Mukanganyama, S.** (2007). The inhibition of human glutathione S-transferase activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem Toxicol*.; **45(2)**, 286-95.
- [198] **Barchi D.H., Rundhaugen, L.M., Pillay, N.S.** (1995). Ellagic acid induces transcription of the rat glutathione S-transferase-Ya gene. *Carcinogenesis*. **16(3)**, 665-8.
- [199] **Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C., Chung, J.G.** (2005). Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res*.; **25(2A)**, 971-9.
- [200] **Mertens-Talcott, S.U., Bomser, J.A., Romero, C., Talcott, S.T., Percival, S.S.** (2005). Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *J Nutr*.; **135(3)**, 609-14.
- [201] **Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C., Reb, G.G., Nixon, W.** (1999). p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters* **136**, 215±221.
- [202] **Cerda, B., Espin, C.J., Para, S., Martinez, P., Tomas-Barberan, F. A.**, (2004). The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6-hydroxydibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans, *European Journal of Nutrition*, **43**, 205-220.
- [203] **Cerda, B., Llorach, R., Ceron, J.J., Espin, C. J., Tomas-Barberan, A.F.**, (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice, *European Journal of Nutrition*, **42**, 18-28.
- [204] **Seeram, N.P., Lee, R., Heber, D.**, (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, *Clinica. Chimica. Acta*, **348**, 63-68.
- [205] **Espín et al.** (2007). The Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10476–10485

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Gurbet CELİK  
**Doğum Tarihi:** : 17 Eylül 1986  
**Yazışma Adresi** : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü 20070 Denizli, Türkiye  
**Tel** : 0530 6613843  
**E-mail** :gurbet\_clk@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

**Yüksek Lisans (2009-2012)** :Biyoloji Anabilim Dalı, Pamukkale Üniversitesi  
**Lisans (2005-2009)** :Biyoloji Bölümü, Pamukkale Üniversitesi  
**Lise (2000-2004)** :Salih Dede Lisesi

### *Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı*

“Ege Bölgesine Ait Çeşitli Gıdaların Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücrelerinde Aromataz Enzimi Üzerine Etkileri ” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, PAÜ, Denizli, 2007.

### *Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı*

“Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Moleküler Yaklaşımlar ile Aydınlatılması” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, 2011.

### **Yayınlar**

Arslan S., Ozgun O., **Celik G.**, Semiz A., Düşen O., Mammadov R. ve Sen A (2011). Effects of Cyclamen Trochopteranthum on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes, Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63 (3), 545-555.

### **Özeti Basılanlar (Ulusal ve Uluslar Arası)**

1. Gul O. A., **Celik G.**, Akca H. et al. (2011) Effect of ellagic acid on p53 and PTEN in various cell lines. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 209-209
2. Ozyurt R., Semiz A., **Celik G.**, et al. (2011) Modulations of drug metabolizing enzymes by in vivo treatment of *Epilobium hirsutum* extract in rat. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 225-226

3. Semiz A., **Celik G.**, Karakurt S., et al. (2011). In vivo effects of *Epilobium hirsutum* extract on different glutathione transferase isozymes. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 233
4. Todurga Z. G., Adali O., **Celik G.**, et al. (2011) *Antioxidant capacity of Epilobium hirsutum* in rats. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 235
5. Yasar I., Ozyurt R., Todurga Z., **Celik G.** et al. (2011) Diverse action of 5-aminosalicylic acid on cytochrome P450 expression in human cervical cancer cell line. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 239-240
6. Sen A., **Celik G.**, Semiz A., et al. (2011) Effects of ellagic acid on CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2, NQO1 and GSTMu enzymes in rat. FEBS Journal 278: Suppl: 1 pp: 241
6. Sen A., Akca H., **Celik G.** (2010) Dietary Aromatase Inhibitors in Human Non-Small Cell Lung Cancer. Drug Metabolism Reviews, 42: Suppl: 1 pp: 171.
7. Semiz, A., Karakurt, S., **Çelik, G.**, Gençler-Özkan, A. M., Adalı, O., ve Şen, A. (2010) Sıçanlarda Glutasyon S-Transferazlar ve Antioksidan Enzimlerin *Epilobium hirsutum* Bitki Ekstraktları ile Değişimi. 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Book of Abstract: 203-204 (PA038).
8. **Çelik, G.**, Semiz, A., Karakurt, S., Adalı, O., ve Şen, A. (2010) Ellajik Asitin Faz I Enzimleri Üzerine Etkileri. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Book of Abstract: 209-210 (PA045).
9. Ozgun O., **Celik G.**, Sen A., Arslan S. (2010) Akrilamidin İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattında (HepG2) Sitokrom P4501A1, 1A2, 2E1 ve 3A4 mRNA Ekspresyon Düzeylerinde Olan Etkisi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Book of Abstract: 214 (PA048).