TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

STEVİANIN RAT KARACİĞERİNDE OKSİDAN/ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ebru GÜRLEYİK

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Aslıhan AVCI

ANKARA
2010

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan "Stevianın Rat Karaciğerinde Oksidan/Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı, Dr Ebru GÜRLEYİK'e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13 / 12 / 2010

Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Erdinç DEVRİM
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bana bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanı Hocam Sayın Doç. Dr. Aslıhan Avcı başta olmak üzere, Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na ve değerli Hocalarım Sayın Prof. Dr. İlker Durak, Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar, Sayın Prof. Dr. H. Serdar Öztürk, Sayın Doç. Dr. B. İmge Ergüder ve Sayın Doç. Dr. Erdinç Devrim'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına, S.B. Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nden Sayın Dr. Gönül Erden'e, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Sayın Dr. Sibel Kılıçoğlu'na şükranlarımı sunarım.

Asistanlığım süresinde birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalının diğer çalışanlarına katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan ve hiçbir özveriden kaçınmayan sevgili aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ebru GÜRLEYİK

Ankara-2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	ix
Tablolar Dizini	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stevia Rebaudiana (Bertoni)	3
2.1.1. Kaynağı	3
2.1.2. Kimyasal Yapısı ve Tatlandırıcı Özelliği	3
2.1.3. Ekstraksiyon ve Saflaştırılması	5
2.1.4. Steviosidin Farmakokinetiği	5
2.1.5. Biyolojik Etkileri	8
2.1.6. Toksisite, Karsinojenite ve Teratojenite	14
2.2. Serbest Radikaller, Oksidatif ve Nitrosatif Stres	17
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	19
2.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri	23
2.2.3. Serbest Radikallerin Lipid, DNA ve Protein Üzerine Etkileri	24
2.2.4. Serbest Radikal Kaynakları	27
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi	29
2.3.1. Enzim Olan Antioksidanlar	30
2.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar	34
2.4. Tatlandırıcılar	40
2.5. Diabetes Mellitus, Komplikasyonları ve Serbest Radikaller Arasındaki İlişki	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Deney Hayvanları	40
3.2. Gereçler	45
3.2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
3.2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	45

3.3. Protein Düzeyi Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi) 45
3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri 46
3.4.1. Malondialdehit Düzeyi Ölçüm Yöntemi 46
3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi 48
3.4.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi 49
3.4.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi 50
3.4.5. Ksantin Oksidaz (XO) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi 51
3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi 52
3.6. Histopatolojik Değerlendirme 52
3.7. Doku DNA Ekstraksiyonu 53
3.8. İstatistiksel Değerlendirme 53
4. BULGULAR 54
4.1. Oksidan ve Antioksidan Parametre Bulguları 54
4.2. Biyokimyasal Bulgular 55
4.3. Histopatolojik Bulgular 56
4.4. Doku DNA Ekstraksiyon Bulguları 57
5. TARTIŞMA 58
6. SONUÇLAR 64
ÖZET 65
SUMMARY 66
KAYNAKLAR 67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGEs: İleri Glikasyon Son Ürünleri

C: Konsantrasyon

CAC: Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu

CAT: Katalaz

Cl: Klor

Cu: Bakır

ÇDYA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi

dk: Dakika

dl: Desilitre

DM: Diabetes Mellitus

ΔOD: Absorbans (optik dansite) farkı

DPPH:1-1-difenil 2-pikril hidrazil

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

F: Faktör

$FADH_2$: Flavin adenin dinükleotid (indirgenmiş, redükte)

Fe: Demir

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

g: Gram

GR: Glutatyon Redüktaz

GSH: Glutatyon (indirgenmiş, redükte)

GSH-Px: Glutatyon Peroksidaz

GSSG: Yükseltgenmiş (okside) Glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

H_2O: su

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik asit

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HNE: 4-hidroksi-2-nonenal

HOCl: Hipoklorik asit

HOO•: Hidroperoksil radikali

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromotografisi

HRV: Human Rota Virüsü

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IU: İnternasyonel Ünite

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

JECFA: Gıda Katkıları Üzerine Uzman Ortak Komitesi (FAO/DSÖ)

K: Kör

L: Litre

L•: Lipit radikali

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

Li_2SO_4: Lityum sülfat

LO•: Lipit alkoksil radikali

LOO•: Lipit peroksil radikali

LOOH: Lipit hidroperoksit

M: Molarite (mol/L); molar

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

mIU: Miliinternasyonel Ünite

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mmol: Milimol

Mn: Mangan

Mo: Molibden

MPO: Myeloperoksidaz

µl: Mikrolitre

µmol: Mikromol

NBT: Nitroblue tetrazolium

Na_2MoO_4: Sodyum molibdat

Na_2WO_4: Sodyum tungstat

NF-κB: Nükleer Faktör kappa B

Nm: Numune

nm: Nanometre

nmol: Nanomol

nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NO•: Nitrik oksit radikali

NO_2•: Nitrojen dioksit radikali

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

OAKB: Ortalama Arteriyel Kan Basıncı

O_2: Moleküler oksijen

O_2•$^-$: Süperoksit radikali

$^1O_2$: Singlet oksijen

OD: Optik Dansite, absorbans

OH•: Hidroksil radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit

PPAR: Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör

R• : Karbon merkezli radikal

RNT: Reaktif Nitrojen Türleri

ROO• : Peroksil radikali

ROOH: Hidroperoksit

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RS• : Tiyil radikalleri

SD: Standart Sapma

SOD: Süperoksit dismutaz

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

St: Standart

TBA: Tiyobarbitürik asit

TBARS: Tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler

TCA: Trikloroasetik asit

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TG: Trigliserit

TPA: 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat

TPD: Total Periferal Direnç

U: Ünite

UQ: Ubikinon

VA: Vücut Ağırlığı

v/v: Hacim/hacim

w/v: Ağırlık/hacim

XD: Ksantin Dehidrogenaz

XO: Ksantin Oksidaz

Zn: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Stevianın Kimyasal Yapısı 4
Şekil 2.2: Steviosid ve İlgili Bileşenlerin Kimyasal Yapısı 5
Şekil 2.3: Steviosidin Antihiperglisemik Etki Mekanizması 10
Şekil 2.4: Steviosidin Antihipertansif Etki Mekanizması 11
Şekil 2.5: Serbest radikallerin hücresel hedefleri 25
Şekil 2.6: İskemi ve reperfüzyon olayı 28
Şekil 2.7: Serbest radikallere karşı antioksidan savunma sistemi 29
Şekil 2.8: Flavonoidlerin yapısı 35
Şekil 2.9: Askorbik Asitin Çeşitli Formları ve Radikalle (R•) Reaksiyonu 37
Şekil 4.1: Kontrol ve Deney Grubu Karaciğer Dokusu Kesitlerinin Işık Mikroskobisi Görüntüleri (Hematoksilen-Eozin Boyasıyla) 56
Şekil 4.2: Dokulardan elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü 57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri 19
Tablo 3.1: Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi Protokolü 46
Tablo 3.2: MDA Düzeyi Ölçüm Yöntemi Protokolü 47
Tablo 3.3: SOD Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü 49
Tablo 3.4: GSH-Px Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü 51
Tablo 3.5: XO Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü 52
Tablo 4.1: Kontrol ve Deney Gruplarının Karaciğer Dokusunda Oksidan-Antioksidan Parametreler 54
Tablo 4.2: Kontrol ve Deney Gruplarının Kan Biyokimya Değerleri 55

1. GİRİŞ

Stevia *rebaudiana*, Asteracea ailesinin bir üyesi olan uzun ömürlü bir bitkidir. Anavatanı Güney Amerika, özellikle Paraguay olup Meksika, Japonya, Çin, Güney Kore, İspanya, Amerika ve İngiltere'de yetiştirilmektedir. Halk arasında şeker otu, ballı yaprak olarak bilinen bu bitki yüzyıllar boyunca Brezilya ve Paraguay yerlileri tarafından doğal tatlandırıcı olarak kullanılmıştır. S. *rebaudiana*, steviol glikozidleri olarak bilinen en az sekiz değişik şeker glikozidi içeren kompleks bir yapıdadır. Ana bileşenleri steviosid ve rebaudiosid A'dır (1).

Steviosid, steviosid veya stevia özütü şeklinde şeker bileşeni ve ticari tatlandırıcı olarak nitelendirilmektedir. Meyve suyu, kurutulmuş deniz ürünleri, soya sosu, şeker, sakız, yoğurt, dondurma, diş macunu gibi birçok gıda ve çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır. Stevia özütü ve steviosid Brezilya, Kore, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda katkı maddesi olarak kullanımı onaylanmış ve diyet desteği olarak tüketimine izin verilmiştir. FAO/DSÖ Gıda Katkıları Üzerine Uzman Ortak Komitesi (JECFA) tarafından steviosid için kabul edilebilir günlük alım olan 5,0 mg/kg kadar tüketilebileceği açıklanmıştır (2).

Tatlandırıcı özelliğinin yanı sıra stevia özütü ve steviosidin insan sağlığı üzerine antihiperglisemik, antihipertansif, antioksidan, anti-human rota virüs aktivitesi gibi yararlı etkileri mevcuttur (3).

Oksidasyon tüm canlı organizmalarda canlılığın devamlılığı için enerji üretimi açısından gerekli bir biyolojik süreçtir. Bu süreçte ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) aşırı üretimi veya buna karşı antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, diabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın temel nedeni olarak düşünülmektedir (4).

Yaşlanma, diyet alışkanlıklarının değişmesi ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlı olarak, son yıllarda tip 2 diabetes mellitus ve obezite insidansında ciddi artışlar meydana gelmektedir. Bu metabolik sendromlar gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde başlıca halk sağlığı problemi haline gelmektedir. Bu nedenle gıda maddeleri olarak şekersiz (tatlandırıcı içeren) ve kalorisi azaltılmış yiyecek ve içecek kullanımı tercih edilmektedir.

Son zamanlarda diabetin tedavisinde alternatif tıp ve bitkilerin kullanımı giderek artmaktadır. S. *rebaudiana* Güney Amerika'da uzun süredir diabetin tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitkinin özütündeki temel bileşen olan steviosid, kalorisiz ve çok yüksek tatlandırıcı özelliğe sahip olup tatlandırıcı amaçlı az miktarlarda kullanımı yeterlidir (2).

Özellikle obez kişilerde ve diabetik hastalarda şeker yerine kullanılabilecek iyi bir alternatif olduğu düşünülen stevianın tatlandırıcı olarak ticari preparatlarının piyasaya sürülmesi ve gıda maddelerinin içerisinde tatlandırıcı olarak kullanılmasıyla tüketimi gün geçtikçe artmaktadır. Tanımlanmış birçok yararlı etkilerinin yanında kanıtlanmamış olası toksik ve karsinojenik etkilerinin varlığı konusu tartışmalıdır. Bizim çalışmamızdaki amaç, stevia verilen ratlarda, stevia ve onun oksidatif metabolitlerinin, maligniteler de dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde etkili olduğu düşünülen oksidan/antioksidan sistem parametrelerine etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla ticari olarak satılan ve stevia özütü içeren tatlandırıcı ile beslenen ratların karaciğer dokusunda oksidan stresin bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeyleri ile antioksidan enzimler olan katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile ksantin oksidaz (XO) aktiviteleri çalışıldı. Ayrıca çalışma gruplarındaki ratların serumlarında biyokimyasal analizler ve karaciğer dokularının histolojik incelemesi ile doku DNA ekstraksiyonu yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stevia *rebaudiana* (Bertoni)

Obezite ve diabet insidansında artışa bağlı olarak diyette kullanılan glukoz ya da sukroz yerine tatlandırıcılar tercih edilmektedir. Son yıllarda çalışmalar özellikle Güney Amerika'da yaygın olarak kullanılan Stevia *rebaudiana* (Bertoni) özütünden elde edilen ve tatlı bir glikozid olan steviosid üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Stevia, S. *rebaudiana* bitkisinden elde edilen ve gıda içeriklerinde kullanılan jenerik bir terminolojidir. Steviol glikozidleri, S. *rebaudiana*'dan elde edilen ve saflaştırılan yoğun tatlı bileşenler grubu olup steviosid ve rebaudiosid A ana steviol glikozidleridir (5).

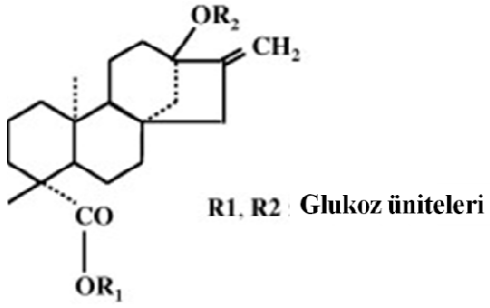
2.1.1. Kaynağı

S. *rebaudiana* (Bertoni), anavatanı Güney Amerika olan Asteraceae (Compositae) ailesinin küçük ağaçsı bir bitkisi olup, tatlı olması nedeniyle *ballı yaprak, tatlı yaprak, şeker otu* olarak adlandırılmaktadır. Güney Amerika yerlileri tarafından stevia özütü yüzyıllardır tatlandırıcı ve geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. 1887'de bir botanist olan Antonio Bertoni tarafından keşfedilmesi ile stevia Güney Amerika dışında da bilindik hale gelmeye başlamıştır. Yaprakların tatlandırıcı ve olası terapötik özelliği nedeniyle ekonomi ve bilim dünyasının dikkatini çekmektedir. Japonya steviosidi gıda ve ilaç endüstrisinde pazara sunan ilk Asya ülkesidir. Daha sonra Çin, Malezya, Singapur, Güney Kore, Tayland gibi birçok Asya ülkesinde bu bitkinin tarımı yapılmaya başlanmıştır. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa'da yetiştirilmektedir (2,5).

2.1.2. Kimyasal Yapısı ve Tatlandırıcı Özelliği

S. *rebaudiana* yapraklarından izole edilen ve tatlı tadı veren steviosid, dulcosid A, rebaudiosid A, B, C, D, E ve steviolbiosid bileşikleri diterpenoid glikozidlerdir (Şekil 2.2). Bu bileşikler aynı kimyasal iskelet yapıya (steviol) (*ent*-13-hydroxykaur-

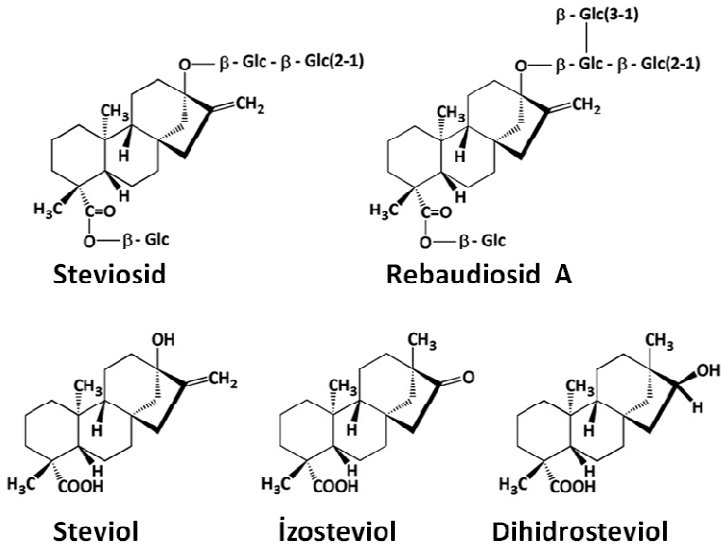
16-en-19-oic acid) sahip olup, C13 ve C19 pozisyonundaki karbonhidrat rezidüleri farkı meydana getirir. Tatlandırıcı özelliğindeki ana bileşen olan steviosid, üç glukoz molekülü ve bir diterpenoid glikozid olan steviol içermektedir (Şekil 2.1). Bu bileşenler, bitki çeşitliliğine ve yetişme şartlarına göre yaprakların kuru ağırlığının % 4-20'sini oluşturur (2,6).



Şekil 2.1: Stevianın Kimyasal Yapısı – Uchiyama ve ark. (7)'dan alınmıştır.

Yapraklardaki tatlı tadı veren bileşenler sırasıyla, steviosid (ana bileşen) (yaprakların kuru ağırlığının % 5-10'u), rebaudiosid A (yaprakların kuru ağırlığının % 2-4'ü), rebaudiosid C (yaprakların kuru ağırlığının % 1-2'si), dulcozid A (yaprakların kuru ağırlığının % 0,4-0,7'si)'dır. Bu glikozidler sukroz ile karşılaştırıldığında sukroza (% 0,4'lük solüsyon) göre dulcosid A 5-120 kat, rebaudiosid A 250-450 kat, rebaudiosid B 300-350 kat, rebaudiosid C 50-120 kat, rebaudiosid D 250-450 kat, rebaudiosid E 150-300 kat, steviobiosid 100-125 kat ve steviosid 300 kat daha tatlıdır. Steviosid tatlı olmasına rağmen yapısındaki esansiyel yağlar, taninler ve flavonoidlerden dolayı ağızda istenmeyen acımsı bir tat bıraktığından bunu engellemek için steviosid, izomaltaz, β-galaktosidaz veya dekstrin sakkaraz ile enzimatik modifikasyon gerçekleştirilmektedir (2,8).

S. *rebaudiana* yapraklarında ent-kauren glikozidlere ek olarak askorbik asit, β-karoten, krom, kobalt, magnezyum, demir, potasyum, fosfor, riboflavin, tiamin, çinko, stigmasterol, β-sitosterol, kampesterol ve çeşitli flavonoidler içermektedir (8).



Şekil 2.2: Steviosid ve İlgili Bileşenlerin Kimyasal Yapısı - Chatsudthipong (2)'dan alınmıştır.

2.1.3. Ekstraksiyon ve Saflaştırılması

S. *rebaudiana* yapraklarından steviosidin izolasyonu kloroform-metan, gliserol, propilen glikol gibi çözücülerle sıvı ekstraksiyonu, dekolorizasyon, koagulasyon, iyon değişim kromotografisi ve kristalizasyon gibi yöntemlerin yer aldığı çeşitli işlemleri içermektedir. Steviosidin saflaştırılmasında kullanılan en iyi teknik iyon-değişim kromotografisidir (2).

2.1.4. Steviosidin Farmakokinetiği

Steviosid ve metabolik ürünlerinin farmakokinetiği, bu moleküllerin absorbsiyonunu, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını içermektedir.

a) Absorbsiyon

Steviosid, yüksek moleküler ağırlığa (804,9 g/mol) sahip olan hidrofilik diterpenoid bir glikozid olup barsakta emilimi pek mümkün değildir. Ayrıca hayvanlar ve insanlardaki mide özsuyu ve sindirim enzimleri steviosidi degrade edememektedir. Bunun yanında, domuzlar, ratlar ve insanların bakteriyel intestinal

florası steviosidi aglikan formu olan steviole çevirebilmektedir (3,9). Bacteroides grubu alt gastrointestinal yolakta bu değişimden sorumlu bakterilerdir (3). Steviol, stevia ve bileşenlerin intestinal mikrofloradaki son ürünü olup daha fazla metabolize olamamaktadır (6,9,10).

Steviol emilimi pasif difüzyon ve monokarboksilik taşıyıcı aracılı transport ile gerçekleşmektedir. Steviosidin oral alımında barsaklardan kana geçen bileşen stevioldür.

b) Dağılımı ve metabolizması

Steviolün organlardaki dağılımı ortaya koymak onun sistemik ve toksik etkilerini anlamak için öngörü sağlamaktadır.

Steviosidin farmakokinetiğinin incelendiği bir çalışmada radyoaktif madde işaretli steviosidin tek doz oral alımı sonrasında karaciğer, barsak ve böbreklerde ciddi miktarlarla radyoaktivite tespit edilmiştir (11). Safrada yapılan HPLC sonuçlarına göre ana metabolit stevioldür. Sonuçlara göre, steviosidin steviole metabolik dönüşümü karaciğerde olmaktadır ve ekskresyon safra ve idrar ile gerçekleşmektedir. Steviol enterohepatik dolaşıma katılarak reabsorbe edilmektedir.

Steviol, steviosidin oral alımını takiben kan dolaşımındaki major metabolittir ve karaciğerdeki metabolizması dikkatle incelenmelidir. Bir çalışmada, steviol β-glukronidaz/sulfataz enzimi ile hidrolize edildiğinde kanda ve idrarda steviol glukronid bileşikleri tespit edilmiştir. Geliştirilen hipoteze göre, kolondaki bakteriler tarafından steviosid, steviole indirgenmekte ve steviolün bir kısmı kolondan emilerek portal dolaşımla karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerde oluşan steviol glukronidleri dolaşıma geçerek böbreklerde süzülüp idrarla atılmaktadır (10). Bir başka çalışmada, steviol, rat ve insanların hepatik mikrozomları ile inkübe edildiğinde steviolün oksidasyon (monohidroksi ve dihidroksi) metabolitleri ortaya çıkmıştır. Bunlar hidroksisteviol, 15-okzo-steviol, stevio-16,17-epoksit, dihidroksisteviol'dür (12). Bu süreçte NADPH üretimi gerektirmekte olup, steviolün faz I metabolizması sitokrom P450 ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Bunun yanında daha önce ratlarda yapılan in vivo çalışmalarda, safrada bilinmeyen steviol konjugatlarının olduğu saptanmıştır.

Faz I metabolizmasına ilaveten steviol idrarla elimine olmadan önce glukronidler ile konjuge olmak üzere faz II detoksifikasyon metabolizmasına uğrar (13).

Roberts ve Renwick (2008) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, ratlarda rebaudiosid A, steviosid ve steviol oral alım sonrası yaygın bir biçimde emilime uğramaktadır. Barsak mikroflorası tarafından rebaudiosid A ve steviosid, steviole metabolize olmaktadır. Steviolden de vücutta steviol glukronidleri oluşmakta ve safra ile gastrointestinal kanala salınmaktadır. Steviol glukronidlerinin büyük bir kısmı steviole tekrar hidrolize olmaktadır (14).

c) Atılımı

Steviosid ve metabolik ürünlerinin vücuttan eliminasyonunu anlamak steviosidin kullanımına bağlı olası toksikolojik faktörleri değerlendirmek açısından önemli olduğundan birçok insan ve hayvan çalışmaları yapılmıştır. Steviol glukronidleri insanlarda ve ratlarda dolaşımdaki ortak ana metabolittir. Biliyer ve üriner sistem steviol glukronidlerinin ekskresyonunda major yolaklar olarak kabul edilmektedir. Ratlarda steviol glukronidlerinin atılımı safra ile gerçekleşirken (14), insanlarda üriner atılım steviol glukronidlerinin ekskresyonu için predominan bir role sahiptir (10,11,13). İnsanlarda yapılan bir çalışmada oral steviosid alımını takiben 72 saat sonra, idrarda steviol glukronidleri ve feçesteki serbest steviol seviyeleri uygulanan total steviol dozun sırasıyla % 62'si ve % 5,2'si şeklinde saptanmıştır (13). İnsanlarda ve ratlarda steviol glukronidlerini ekskresyonundaki farklılığın, safradaki organik anyonların moleküler ağırlıkları arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir (2).

Sonuç olarak, steviol glukronidi steviosidin major metaboliti olup, insanlarda bu metabolitin vücuttan atılımı üriner ekskresyon yoluyla gerçekleşmektedir. Bu atılım süreci muhtemelen renal organik anyon taşıyıcılar içermektedir (15).

2.1.5. Biyolojik Etkileri

Stevianın insan sağlığı üzerine bilinen yararlı etkileri arasında *antihiperglisemik, antihipertansif, antioksidan*, *antiinflamatuar, anti-human*

rotavirüs aktivite yer alırken, glukoz metabolizması, kardiyovasküler ve renal sistemler üzerine de etkileri bulunmaktadır.

2.1.5.1. Glukoz Metabolizması ve Lipid Profili Üzerine Olan Etkisi

Yüzyıllardır kullanımına rağmen stevianın destek ajan olarak kullanımına dair yeterli klinik veri bulunmamaktadır. Sağlıklı bireylerle yapılan bir çalışmada, stevia yapraklarından hazırlanan özütün glukoz tolerans testi üzerine olan etkileri incelenmiştir. 5 g yapraklarla hazırlanan sulu özüt bireylere 3 gün boyunca 6 saat aralıklarla verilmiş ve plazma glukoz düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (8). Ayrıca steviosid ve steviolün diabetik ratlarda insulin salınımına olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki bileşenin de antihiperglisemik, insulinotropik ve glukagonostatik etkileri ortaya konmuştur (16).

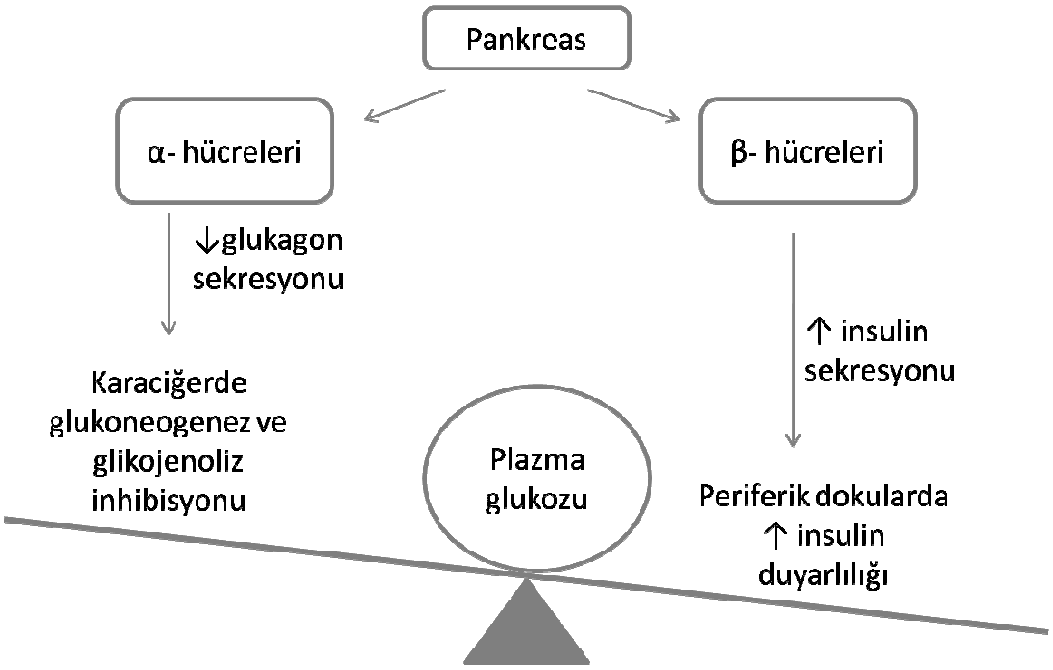
Diğer bir yandan bir çalışmada, 3 ay süreyle 750 mg/gün steviosid (% 92 saflıkta) tatlandırıcı olarak kullanılmış, tip 1 ve tip 2 diabetik hastalarda herhangi bir farmakolojik etki (kan glukozunda veya kan basıncında azalma gibi) gözlenmemiştir. Ortaya çıkan bu sonucun nedeni bilinememekle birlikte steviosidin yalnızca çok yüksek değerlerde kan glukozu ve kan basıncı üzerine düşürücü etki oluşturduğu düşünülmektedir (17). Bu sonuçlar daha önce Geuns ve ark.'nın yaptığı bir çalışmanın sonuçları ile tutarlılık göstermektedir. Bu çalışmaya göre sağlıklı bireylere 3 gün boyunca 750 mg/gün steviosid (% 97 saflıkta) oral olarak verilmiş ve kan basıncı, kan glukozu ile insulin konsantrasyonu açısından anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (10).

Ayrıca başka bir çalışmanın sonuçlarına göre steviosid, steviol ve steviosidin metabolik bir bileşiği olan isosteviol, lipid profilini düzeltmekte, β-hücre gen ekspresyonunu arttırmakta (insulin düzenleyici transkripsiyon faktörleri de dahil) ve böylece glukoz homeostazının düzenlenmesi, insulin duyarlılığının artması ve plazma trigliserit düzeylerinin azalmasıyla diabetik farelerde kilo kaybı gerçekleşmektedir (18).

Tip 2 diabetes mellitusun, hipertansiyon ve dislipidemilerle birlikteliği nedeniyle hastalarda kullanılacak olan en ideal farmakolojik ajan, plazma glukoz ve lipid düzeyleri ile kan basıncını düşürmelidir. Steviosidin birçok çalışmada (16,19)

belirtildiği gibi hipoglisemik ve hipotansif etkisi nedeniyle bu hastalarda kullanımı fayda sağlayabilmektedir. Glukoz metabolizması üzerine olumlu etkilerinin yanında tip 2 diabetik hastalarda postprandiyal kan glukoz düzeylerini azaltması nedeniyle tip 2 diabet tedavisinde avantaj sağlamaktadır (20). Soya proteinin serum kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol ve trigliserit (TG) düzeylerini düşürücü etkisi vardır (21). Soya proteini ile steviosid kombine kullanımı sinerjistik bir etki oluşturmakta ve diabetiklerde insulin yanıtını düzenlediği, glukagon düzeylerinin azalttığı ve antihiperglisemik etki sağlamaktadır (22,23). Buna ek olarak, hiperkolesterolü olan bayanlarda yapılan bir çalışmada Stevia özütünün tüketiminin kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerini azalttığı, HDL-kolesterol düzeylerini de arttırdığı bulunmuştur. Bu nedenle stevia özütünün hipolipidemik etkiye sahip olduğu ve kardiyovasküler hastalıklarda direnci azaltmak için kullanılabilir olduğu düşünülmektedir (8). Yüksek yağlı diyetle beslenen ve tatlandırıcı olarak sukroz ve stevia özütünün kullanıldığı C57BL/6J fareleriyle yapılan bir çalışmada hayvanların kiloları, serum ve karaciğer lipid profili ile karnitin düzeyleri ve hepatik mRNA analizi çalışılmıştır. Çalışmada stevia özütü kullanımının kilo alımı ile serum ve karaciğer trigliserit, total trigliserit düzeylerini azalttığı saptanmıştır. Ayrıca PPARα aktivitesi üzerinden karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu kodlayan genlerin ekspresyonunda artışa neden olduğu düşünülmektedir (24).

İnsan ve hayvan çalışmalarında, steviosid ve bileşikleri, insulin sekresyonunu ve duyarlılığını düzenleyerek glukozun plazmadan uzaklaşmasını artırmakta ve böylece plazma glukozunu etkilemektedir. Ayrıca intestinal glukoz emilimini ve karaciğerdeki glukoz sentezi sırasında birçok anahtar enzim aktivitesini düzenleyerek glukoz oluşumunu ve plazmaya glukoz alımını inhibe etmektedir (Şekil 2.3) (2).



Şekil 2.3: Steviosidin Antihiperglisemik Etki Mekanizması - Chatsudthipong (2)'dan alınmıştır.

Steviosidin tanımlanmış bu etkileri plazma glukoz düzeylerine bağımlı olup, yalnızca plazma glukoz düzeyleri arttığında bunlar gözlenebilmektedir. Bu nedenle sağlıklı bireylerde kullanımı güvenilir görünmektedir. Mekanizma tam olarak açıklanamamakla birlikte steviosid ve bileşenlerinin in vivo etkilerine yönelik birçok sayıda çalışma devam etmektedir. Düşük maliyetli olması nedeniyle özellikle gelişmekte olan ülkelerde steviosid, diabetik hastalarda tedavi amaçlı bir ilaç olarak kullanılmaya başlamadan önce çalışmaların birbiri içerisinde tutarlı ve kabul edilir olması gereklidir.

2.1.5.2. Antihipertansif Etki

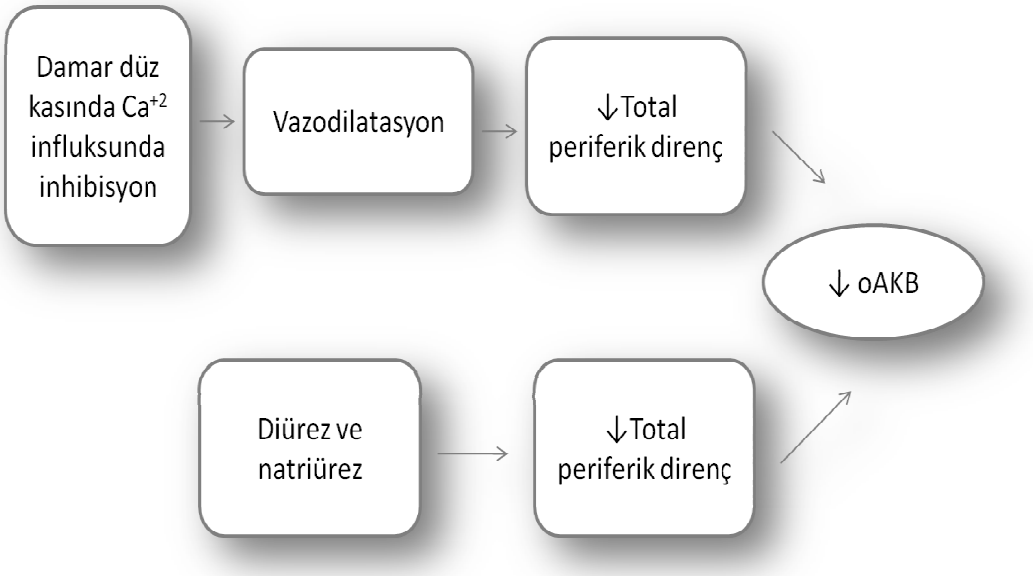
Ortalama arteriyel kan basıncı (OAKB), sistemik vasküler tonus veya total periferal direnç (TPD) ve kan hacmi ile doğrudan değişiklilik göstermektedir. Bu parametrelerdeki herhangi bir değişim OAKB etkilemektedir. Patolojik durumlarda, vasküler direnç/kapasite ile kan hacmi arasındaki dengesizlik sonucu arteriyel hipertansiyon gelişir. Bu nedenle hipertansiyon sistemik bir hastalık olup, ciddi

komplikasyonlara yol açması ve toplumda sık görülmesi nedeniyle önemli bir sağlık problemidir.

İnsan ve hayvan çalışmalarında steviol glikozidlerinin antihipertansif etkisi belirtilmektedir (10,19,25,26). Bunun yanında normal kan basıncına sahip sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada, oral steviosid (750 mg/gün) kullanımı OAKB'nda herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (10).

Steviosidin antihipertansif etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da plazma hacmi üzerine olan etkileriyle ilişkilendirilmektedir. Periferik vasküler direnci belirleyici olan myokardiyal kontraksiyon ve vasokonstrüksiyon için Ca^{+2} önemlidir. İntravenöz steviosid enjeksiyonu Ca^{+2} yolakları üzerinden vasodilatasyon oluşturarak doza bağımlı hipotansif etki meydana getirmiş ve ayrıca ratlarda natriürez, diürez ve renal plazma akımında artışa neden olmuştur (2).

Hayvan ve insan çalışmalarında, steviosid ve stevia özütünün vasodilatasyonu (azalmış TPD) ve diürezi indükleyerek plazma hacminin azalmasına ve OAKB'da düşmeye neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.4) (2).



Şekil 2.4: Steviosidin Antihipertansif Etki Mekanizması - Chatsudthipong (2)'dan alınmıştır.

Periferik damarlarda dilatasyona neden olarak hipotansiyon oluşturması nedeniyle hipertansif acillerde steviosidin intravenöz kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir. Damar endoteli sağlam olduğu sürece steviosidin antihipertansif etkisinin nitrik oksit sentaz aktivitesine de bağımlı olduğu gösterilmiştir (27).

Normal kan basıncına sahip bireylerde steviosid kullanımı kan basıncı parametresi üzerine herhangi bir etkiye sahip değilken, hipertansif hastalarda kan basıncını düşürücü etki göstermektedir. Bu nedenle normal sağlıklı bireylerde hipotansiyon gelişimi açısından göreceli olarak çok düşük bir risk taşımaktadır.

2.1.5.3. Antioksidan Etki

Serbest radikallerin üretimi antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında çeşitli bozukluklar ortaya çıkar. Bu nedenle radikallerin ortamdan temizlenmesi ve radikalik reaksiyonların durdurulabilmesi için antioksidan aktivite önemlidir. Bitkilerdeki fenolik bileşikler indirgeyici, hidrojen verici, metallerle şelasyon yapabilme özelliklerine bağlı olarak antioksidan aktivite göstermektedir.

S. *rebaudiana* yapraklarının total fenolik içeriğinin ve in vitro antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, S. *rebaudiana*'nın yüksek fenolik içeriğinden dolayı doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Bu bitkinin lipofilik bir radikal olan 1-1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) radikalini inhibe ederek, hidroksil radikalini, nitrik oksit ve süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksiti ortamdan temizleyerek standart askorbik asit ile karşılaştırıldığında askorbik asite göre daha güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (28). Ayrıca S. *rebaudiana* yapraklarından hazırlanan özütünün güçlü bir radikal temizleyici ve oksidatif DNA hasarını engelleyici aktivitesi zengin flavonoid içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapısında quercetin ve glikolize formu (quercetin-3-O-arabinosid), quercitrin, kaempferol-3-O-rhamnosid, apigenin, luteolin ve apigenin-4-O-glukozid şeklinde çeşitli flavonoidler bulunmaktadır (29).

2.1.5.4. Antiinflamatuar ve Antikanser Etkileri

İnflamasyon, patojen, irritan maddeler, hasarlanmış hücreler gibi çeşitli uyaranlar tarafından damar dokusunda gelişen immun reaksiyon zinciridir ve otoimmun hastalıklar, ateroskleroz ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir.

İn vivo ve in vitro birçok çalışmada steviosidin antiinflamatuar etkisinin varlığı ortaya konmuştur. Lokal olarak 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) uygulamasıyla oluşan deri iltihabı, steviosid ve steviol glikozidlerinin kullanımı ile inhibe olmuştur (30). Ayrıca isosteviol, DNA polimeraz ve insan DNA topoizomeraz II'yi inhibe etmektedir (31).

Doğal ürünlerin kansere karşı koruyucu ajan olarak kullanımına yönelik yapılan çalışmalarda diterpenoid ve triterpenoid bileşiklerin antitümöral etkileri araştırılmaktadır. Steviosid, steviol ve izosteviolün farelerde deri kanseri oluşumunu inhibe ettiği ve kimyasal karsinogenez modellerinde kansere karşı olası koruyucu ajan olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (32).

Steviosid ve steviol, insan kolon epitel hücreleri üzerinde antiinflamatuar etki göstermektedir. Yapılan bir çalışmada insan kolon hücre serisinde steviosid ve steviolün IL-8 salınımına olan etkisi araştırılmıştır. Toksik olmayan dozlarda steviosid (<2 mM) ve steviol (<0,2 mM) kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre steviolün TNF-α tarafından indüklenmiş IL-8 salınımını baskıladığı ve immunoblast incelemesinde steviolün NF-κB ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (33). Steviosid mikroflora tarafından steviole indirgendiğinden kolit oluşturulan hayvan modellerinde oral steviosidin inflamasyonu ve kanser transformasyonunu azaltıcı etkilerini değerlendirmek açısından yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır.

Steviosidin in vivo immunmodülatör etkisinin ortaya konduğu çalışmada, steviosid ile beslenen farelerde uyarılmış fagositik fonksiyon ve artmış humoral yanıt saptanmıştır. İn vitro deneylerde ise steviosidin fagositik aktivite ile B ve T hücre proliferasyonunu uyardığı ortaya konmuştur (34). Bu nedenle enfeksiyonlara karşı bağışıklığı desteklemesi nedeniyle steviosidin oral kullanımı faydalı olabilir.

2.1.5.5. Anti-Human Rota Virüs Aktivitesi

Human rota virüsü (HRV) dünya genelinde çocukluk çağında ciddi dehidratasyonla birlikte olan ve ölümle sonuçlanabilen gastroenterit nedenidir. Enfeksiyonu önlemek amacıyla birçok aşı geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bunun yanında in vitro yapılan bazı çalışmalarda çeşitli maddelerin, bitki özütlerinin her ne kadar rota virüse inhibitör etki oluşturduğu bulunduysa da klinik kullanımda yer almamaktadır (35).

Yapılan bazı çalışmalarda da S. *rebaudiana*'dan hazırlanan sıcak özütün enterohemorajik E. *coli* üzerinde bakterisidal etkinin saptanırken patojen olmayan Bifidobacteria ve Lactobacilli'ye karşı herhangi bir etki gelişmediği bulunmuştur. Bu çalışmalardaki ısıyla hazırlanan özüt kullanılarak in vitro anti-HRV aktivitesinin araştırıldığı çalışmada bu özütün HRV replikasyonuna karşı inhibitör etki saptanmış olup, bu etkiden S. *rebaudiana*'nın anyonik polisakkarit bileşiğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (35).

2.1.6. Toksisite, Karsinojenite ve Teratojenite

Kalorisiz, ekonomik ve geniş kullanım alanına sahip bir tatlandırıcı olan Stevia'nın tüketimi yaygınlaştıkça temel bileşenleri, özellikle steviosid ve steviol, üzerine yapılan in vitro çalışmalar ve hayvan deneylerinde toksikolojik, karsinojenik ve teratojenik özellikleri dikkatle incelenmektedir.

2.1.6.1. Toksikolojik Çalışmalar

Çeşitli karaciğer ve barsak hücre serilerinde yapılan in vitro çalışmalarda 0,2 mM steviolün hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir. Bu toksik etkinin mitokondri metabolizmasındaki değişikliklerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (33,36).

Yapılan çalışmalarda fare, sıçan ve hamstırlar 15 g/kg VA steviosid ile beslendiğinde herhangi bir akut toksisite gelişmemiştir. Bununla birlikte steviol, hayvan cinsine göre 5-20 g/kg VA dozlarında letal olup, hamstırların steviol toksisitesine daha duyarlı olduğunu gösterilmiştir. Steviol alan hamstırların histolojik

incelemesinde proksimal tübül hücrelerinde dejenerasyon saptanmıştır. Bu değişikliğin serum kan üre azotu ve kreatinin değerlerindeki artışa neden olan böbrek fonksiyonlarındaki bozukluk olup, hamstırların olası ölüm nedeninin akut böbrek yetmezliği olduğu düşünülmektedir (2).

Hem sağlıklı bireylerde hem de diabet ve hipertansiyonu olan hastalarda yapılan bir çalışmada, 3 ay boyunca 750 mg/gün steviosid kullanımının karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile serum elektrolitlerinde herhangi bir anormallik saptanmamış olup steviosidin vücut tarafından iyi tolere edildiği düşünülmektedir (37).

FAO/DSÖ Gıda Katkıları Üzerine Uzman Ortak Komitesi (JECFA)'nin önerisine göre steviol için kabul edilebilir günlük alım 0-2 mg/kg, steviosid için 0-5 mg/kg'dır (2). Daha önce yapılan insan çalışmalarında 4,2 mg/kg steviosid tek doz oral alımında plazma steviol glukronitlerinin ortalama maksimun konsantrasyonu 1,89 μg/ml (3,7 μM) ve plazma serbest steviol konsantrasyonu 0,19 μg/ml (0,38 μM)'dir (13). Bu düzeylerdeki steviol insan hücrelerine toksik olmadığı ve steviol glukronitlerinin tekrar steviole dönüşmemek üzere oluştuğu düşünülmektedir (2).

2.1.6.2. Karsinojenite Çalışmaları

Steviosidin olası karsinojen potansiyeli dikkat çekmekte ve çok sayıda çeşitli deney modelleri oluşturularak steviosidin ve steviolün mutajenik etkileri incelenmektedir. Daha önceleri yapılan bakteriyel genetik incelemelerde steviosidin her ne kadar mutajenik olmadığı (38) söylense de steviolün genotoksik etki potansiyeline yönelik incelemeler tartışmalıdır (2). Salmonella *typhimurium* TM677'nin kullanıldığı bir mutasyon analizinde, steviol karaciğer homojenatı ile metabolik aktivasyona uğradıktan sonra genetik toksisite gelişmiştir (38-40). İlgili bölgede (guanin fosforiboziltransferaz (gpt) geni) saptanan mutasyonlar transizyon, transversiyon, dublikasyon ve delesyon şeklinde tanımlanmıştır (41). Steviolün 15-oxo-steviol gibi oksidatif metabolitlerinin bu mutajeniteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (40). Ayrıca E.*coli* (42) ve memeli hücre kültürü (38) ile yapılan çalışmalarda steviolün kanser oluşumuna neden olan kromozomal kırıklar ve gen mutasyonları gibi genetik değişiklikler oluşturduğu gösterilmiştir.

Steviosidin karsinojenik potansiyelinin incelendiği in vivo çalışmalar da yapılmıştır. Steviosid oral verildiğinde ratlarda kanser insidansında artış saptanmamıştır (38,43,44). Ancak 45 gün boyunca içme sularına steviosid (4mg/ml) eklenen ratlarla yapılan bir çalışmada, comet analiziyle steviosidin periferik kan, karaciğer, beyin ve dalak hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğunu ve gelişen DNA hasarının steviosidin olası mutajenik etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (45). JECFA'ya göre steviosidin in vivo ve in vitro genotoksisitesi olduğunu gösteren kanıt mevcut değildir. Erkeklerde 2,0 g/kg ve kadınlarda 2,4 g/kg steviosid kullanımı herhangi bir kanser insidansını etkilememektedir (2).

2.1.6.3. Fertilite ve Teratojenite Çalışmaları

Steviosidin yaygın kullanımı, steviosid ve bileşenlerinin fertiliteye etkisi ve olası teratojenik etkileri hakkındaki soruları da beraberinde getirmektedir. Yapılan birçok hayvan çalışmasında oral steviosid kullanımının fertiliteyi etkilemediği saptanmıştır (2).

Steviosid ve steviolün olası teratojenik etkisinin incelendiği bir çalışmada, gelişmekte olan tavuk embriyosunun yumurtalarına steviosid ve steviol enjekte edilmiş ve embriyo gelişiminde herhangi bir anormallik olmadığı saptamıştır (46).

Birçok çalışmadaki ortak düşünce steviosidin kabul edilebilir günlük alımı (5 mg/kg) güvenli olup herhangi bir karsinojenik ve teratojenik etki oluşturmadığı yönündedir.

2.2. Serbest Radikaller, Oksidatif ve Nitrosatif Stres

Oksidasyon tüm canlı organizmalarda canlılığın devamlılığı için enerji üretimi açısından gerekli bir biyolojik süreçtir. Ancak enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olarak reaktif ve potansiyel olarak yüksek düzeyde zararlı *serbest radikaller* oluşur. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların organizmadan temizlenmesi arasında bir denge vardır ve bu durum "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.

Radikaller, dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren kimyasal türlerdir ve basit bir atom ya da kompleks yapılı bir molekül olabilirler. Her türlü kimyasal ve biyokimyasal tepkime dış orbitallerdeki elektron seviyesinde gerçekleştiğinden, eşleşmemiş elektrona sahip atom/molekülün reaktivitesi yüksektir. Bu nedenle radikaller, kararsız, kısa ömürlü (yarı ömrü $\leq 10^{-6}$ saniye), moleküler ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar. Hidrojen ($1s^1$), oksijen ($1s^2 2s^2 2p^4$), nitrojen ($1s^2 2s^2 2p^3$), karbon ($1s^2 2s^2 2p^2$) ve diğer bazı elementler atomik yapılarında eşleşmemiş elektron içerdiklerinden doğada atomları şeklinde serbest bulunmayıp moleküller şeklinde bulunurlar.

Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşurlar (47).

1) *Kovalent bağların homolitik kırılması ile.* Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur ve molekülde bağı oluşturan iki elektrondan her birinin tek olarak bir atom üzerinde kalacak şekilde ayrılır. ($A^{\bullet}{}^{\bullet}B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$)
2) *Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile.* Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitasında eşleşmemiş bir elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur.

$(A \rightarrow A^{\bullet+} + e^-)$ ya da $(A^{\bullet\bullet} B \rightarrow A:^- + B^+)$

3) *Normal bir moleküle elektron transferi ile.* Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin $(O_2\bullet^-)$ oluşumuna neden olur. $(A + e^- \rightarrow A\bullet^-)$

Serbest radikaller, tek elektronu ile birlikte pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz (nötr) olabilirler.

Serbest radikaller yeterli bir şekilde vücutta elimine edilemezlerse hücrede lipid peroksidasyonuna, protein konfigurasyon bozukluğuna veya DNA modifikasyonlarına neden olarak doku hasarı ve hücre ölümüne neden olurlar. Sonuç olarak ortaya çıkan oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, kanser, ateroskleroz, amfizem/bronşit, gebelikte preeklemsi, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmun hastalıklar, infertilite gibi birçok durum ve hastalığın oluşmasında veya komplikasyonlarının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (48-51).

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve **reaktif nitrojen türleri (RNT)** normal hücresel metabolizmanın ürünleri olup canlı organizmalarda yararlı ve zararlı olmak üzere iki yönlü etkiye sahiptir. Serbest radikallerin biyolojik hasara neden olan zararlı etkileri oksidatif stres ve nitrosatif stres olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik sistemlerde bu duruma ROT/RNT'nin aşırı üretimi ve enzim olan ve enzim olmayan antioksidanların yetersizliği neden olmaktadır. Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki denge "oksidasyon-redüksiyon (redoks) regülasyonu" olarak adlandırılan bir mekanizma ile sağlanmaktadır (52).

Süperoksit ve hidroksil radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit, nitrik oksit başta olmak üzere reaktif oksijen ve nitrojen türleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir (47).

Tablo 2.1: Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri - Sözmen (47)'tan alınmıştır.

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH•)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali (ROO•)	Singlet oksijen ($^1O_2$)
Alkoksil radikali (RO•)	Ozon (O_3)
Organik radikaller (R•)	Hipokloröz asit (HOCl)
Organik peroksit radikali (RCOO•)	Azot dioksit (NO_2)
Nitrik oksit (NO•)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu (spinleri aynı yönde) iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir ve diradikal olarak adlandırılır. Diradikal yapıya sahip olan oksijen molekülü herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için elektron dağılımı iki farklı yolla değiştirilir.

1. *Oksijene elektron transferi ile.* Serbest metal iyonları (Fe, Cu, Mn, Zn gibi) veya proteinlere bağlı metal iyonları aracılığıyla oksijene bir veya iki elektron transferi katalizlenebilir. Oksijene tek elektron transferi ile süperoksit radikali (süperoksit anyonu) ($O_2^{\bullet -}$) oluşur. İki elektron transferi ile peroksi ($O_2^{=}$) anyonu oluşur.
2. *Enerji absorpsiyonu ile.* Diradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen ($^1O_2$) oluşur (50).

Moleküler oksijen, diradikal özelliğinin bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir.

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan ilk oksijen radikalidir. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$Fe^{+2} + O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikali canlılarda birçok mekanizmalarla üretilmektedir. Bunlar:

- Elektron transport zincirinde NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olması sonucudur.
- Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, glukoz, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
- Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
- Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Süperoksit radikali, hidroksil radikali (OH•) ile hidroperoksit radikali (HO_2•) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek geçiş metal iyonlarını indirgeyerek hidroksil radikali üretimine neden olur. Süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşikleri (glutatyon, askorbik asit, tokoferol) yükseltger. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidik olduğundan süperoksit burada kolayca bir proton alarak **hidroperoksit radikali**ni (HO_2•) oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve tokoferol gibi zardaki antioksidanları oksitleyebilir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik (spontan) dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

$$O_2 + 2e^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan *süperoksit dismutaz (SOD)* tarafından katalizlenir. Hafif asidik

koşullarda bu dismutasyon reaksiyonu kendiliğinden gerçekleşebilir. Nötral pH'da bu enzimatik dismutasyon çok daha hızlı olduğundan SOD enzimi antioksidan savunma sistemi açısından gereklidir.

Hidrojen peroksit nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz ve biyolojik membranları kolayca geçebilir. Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden bir radikal değildir. Ancak Fe veya Cu gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikali oluşturabildiğinden oksitleyici bir türdür.

Hidrojen peroksit üç mekanizma ile indirgenmektedir. Bunlar:

1. Hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri için substrat olan H_2O_2, bu enzimler tarafından H_2O ve O_2'ye dönüşür. Bu bir detoksifikasyon reaksiyonudur.
2. Nötrofillerdeki myeloperoksidaz (MPO) enzimi ile H_2O_2, hipokloröz asit (HOCl)'e dönüştürülür ve $^1O_2$ oluşur. Fagositik hücrelerde bakterisidal ajan olarak rol alan HOCl güçlü bir oksidandır.

$$O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet -} \longrightarrow H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O$$
$$\downarrow$$
$$HOCl \longrightarrow {}^1O_2 + Cl^-$$

3. H_2O_2'nin metal iyonları tarafından katalizlenen spontan reaksiyonu ile OH• oluşmaktadır.

Reaktif oksijen türleri içerisinde **hidroksil radikali** (OH•) en güçlü radikal olup yarılanma ömrü çok kısadır. Lipid, protein, nükleik asit ve karbonhidrat gibi moleküllerle reaksiyona girme potansiyeline sahiptir. Son derece reaktif olduğundan DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonlarına, zincir kırıklarına, baz delesyonlarına, lipid peroksidasyonu ve protein fragmantasyonuna neden olmaktadır.

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen OH• canlılarda iki mekanizma ile oluşabilmektedir:

1) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.

$$2H_2O \xrightarrow{\text{enerji}} H_2O^+ + e^- + H_2O\bullet$$

Uyarılmış su molekülü (H_2O•) homolitik yıkımla, H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikallerini oluşturur.

2) Hücresel OH• oluşumu

a. Fenton reaksiyonu ile H_2O_2'nin indirgenmesi sonucu

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{+3}$$

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow OH\bullet + OH^- + Cu^{+2}$$

b. Haber–Weiss reaksiyonu ile H_2O_2 ile $O_2\bullet^-$ reaksiyona girmesi sonucu

$$O_2\bullet^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + H_2O_2 + OH\bullet$$

Hidroksil radikali reaktif oksijen türleri içerisinde en güçlüsüdür ve oluştuğunda özellikle yağ asitleri ve tiyoller gibi moleküllerden hidrojen çıkarılması ile karbon merkezli radikaller (R•) ve tiyil radikalleri (RS•) oluşur. Karbon merkezli radikaller ortamdaki bir oksijen molekülü ile tepkimeye girerek peroksi radikalini (ROO•); peroksi radikali ise OH• gibi davranarak bir diğer organik molekülden (R′) hidrojen çıkararak yeni bir karbon merkezli radikal (R•′) oluşumuna neden olurken, kendisi hidroperoksit (ROOH) formuna indirgenir. Oluşan yeni karbon merkezli radikal (R•′) ise yukarıdaki gibi yeni bir tepkime dizisini başlatır (49,50,53).

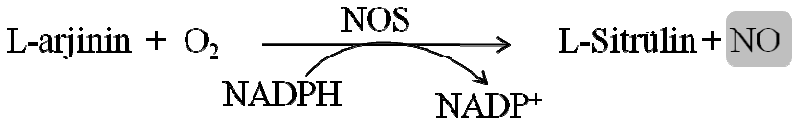
Organik hidroperoksitler stabil bileşikler olmakla birlikte ortamdaki Fe ve Cu gibi metal iyonları varlığında radikalik tepkimelerle parçalanırlar. Ardışık gelişen bu tepkimeler sırasında yeni karbon merkezli radikaller, oksijen radikalleri, karboniller ile sitotoksik aldehitler oluşur. Fe^{+3}, Cu^{+2}, $Mn^{+}2$ ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, ancak bu özellikleri nedeniyle serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Özellikle OH• oluşumu ve devamındaki serbest radikal zincir tepkimelerini katalizlemeleri nedeniyle radikal hasarından sorumlu olan metal iyonları proteinlere bağlı formlarında tutulmalıdır.

Singlet oksijen ($^1O_2$), oksijen molekülündeki eşleşmemiş elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Bu dönüşüm için aldığı enerjiyi dalga enerjisi şeklinde geri verip tekrar oksijene dönüşebilir. Delta (zıt spinli elektronlar aynı orbitalde) ve sigma (ayrı ayrı orbitallerde) olmak üzere iki şekli vardır. Yapısında iki adet eşleşmemiş elektron taşıdığından her iki formun da reaktivitesi çok yüksektir. Retinal, bilirubin gibi pigmentlerin oksijenli ışığı absorplamasıyla, hidroperoksitlerin metal iyonlarıyla

girdiği tepkimelerde, spontan dismutasyon tepkimeleri sırasında, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, myeloperoksidaz enziminin etkisi sırasında oluşmaktadır. Tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, metionin, sistein ve histidin gibi bileşiklerle tepkimeye girer. Özellikle doymamış yağ asitleri ile direkt tepkimeye girerek ROO• oluşturur ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir (50,54).

2.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri

Nitrik oksit (NO•), hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip nitrojen merkezli serbest bir radikal ve diatomik bir gazdır. Endojen olarak L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz (NOS) (EC 1.14.13.39) kataliziyle sentezlenir.



Sinir iletimi, kan basıncının düzenlenmesi, düz kas gevşemesi, immun sistemin düzenlenmesi ve çeşitli savunma mekanizmaları gibi çeşitli fizyolojik olaylarda önemli oksidatif biyolojik sinyal molekülü şeklinde davranmaktadır.

NO• sulu ortamda birkaç saniye gibi yarılanma ömrüne sahip olup düşük oksijen konsantrasyonunda daha kararlıdır.

NO, endotel kaynaklı en önemli vazodilatördür ve vasküler düz kas proliferasyonuna ile trombosit agregasyonuna olumlu etkileri olup antiaterosklerotik özellik taşımaktadır. Ayrıca NO, radikal olması nedeniyle vücutta birçok molekülle reaksiyona girebilir, gaz olması sebebiyle ise hücre ve dokular arasında kolaylıkla difüze olabilmektedir.

Nitrik oksit sentaz birçok dokuda bulunmakla birlikte sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde önemli bir role sahiptir. NOS enziminin nöronal (nNOS, NOS-1), indüklenebilir (iNOS, NOS-2) ve endotelial (eNOS, NOS-3) olmak üzere üç izoformu tanımlanmıştır. eNOS ve nNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılır. Ca^{+2} ve kalmodulin bağımlı esas izoformlardır.

Sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini arttırır. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığıyla hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar. iNOS formu ise aktive makrofajlar olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler (TNF-α, IL-1β) ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir. iNOS enziminin aktivitesi Ca^{+2}'dan bağımsız olup kontrol edilemediğinden, ortamda arjinin bulunduğu sürece aktif olup, uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler (50,55,56).

NO, radikaller ve geçiş metalleriyle hızla reaksiyona girebilmektedir. SOD ile yarışmaya girmesi ve süperoksit ile etkileşmesi sonucu oluşan **peroksinitrit** ($ONOO^-$), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahiptir ve zincir radikal tepkimelerini başlatır, ayrıca biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Peroksinitrit, güçlü bir oksidandır. Bu reaktif ajan, NO toksisitesinin başlıca sorumlusu olup proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır. **Azot dioksit** (NO_2•), hidroksil radikali (OH•), **nitronyum iyonu** (NO_2^+), peroksinitröz asit (ONOOH) gibi toksik ürünlere dönüşür. Peroksinitrit, NO• radikalinin stabil son ürünleri olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'a metabolize edilir. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür.

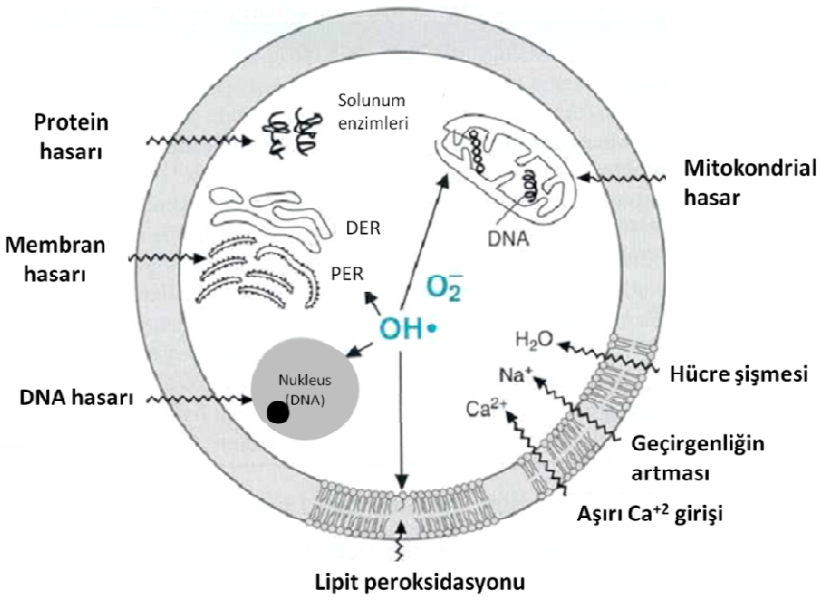
2.2.3. Serbest Radikallerin Lipid, DNA ve Protein Üzerine Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Şekil 2.5).

Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır.

Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) oksidatif yıkımı olarak tanımlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Hücre membranlarında lipid serbest radikallerinin (L•) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşur. Lipid peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer ÇDYA'leri ile reaksiyona girerek yeni lipid radikallerinin oluştururken, açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine

(LOOH) dönüşürler. Lipid hidroperoksit bölünerek lipid alkoksil radikali (LO•) haline gelir. Bu başlama ve ilerleme evrelerini yıkım evresi izler.



Şekil 2.5: Serbest radikallerin hücresel hedefleri – İnsan Biyokimyası, 2002'den alınmıştır.

Bir dizi zincir reaksiyonlar sonucunda çoğu biyolojik olarak aktif olan lipid peroksitler, lipid alkoller ve aldehit yapısında yan ürünler oluşur. Bu bileşikler, membran geçirgenliğini ve viskozitesini önemli derecede değiştirirler. Ancak iki peroksil radikalinin birleşmesi ya da E vitamini gibi bir antioksidan bileşik reaksiyona girerek fenolik hidrojenini vermesiyle bu zincir reaksiyonları sonlanır.

$$LH \rightarrow L\bullet \qquad \text{(başlama tepkimesi)}$$
$$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet \qquad \text{(ilerleme tepkimesi)}$$
$$LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet \qquad \text{(ilerleme tepkimesi)}$$

$$LOO\bullet + LOO\bullet \rightarrow LOOL + O_2 \qquad \text{(sonlanma tepkimeleri)}$$
$$L\bullet + LOO\bullet \rightarrow LOOL$$
$$L\bullet + L\bullet \rightarrow LL$$

$$LOO\bullet + \text{E-vit} \rightarrow LOOH + \text{E-vit}_{oks}$$
$$LOO\bullet + \text{E-vit}_{oks} \rightarrow LOOH + \text{reaktif olmayan ürün}$$

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda son ürünü olarak malondialdehit (MDA) ($OHC\text{-}CH_2\text{-}CHO$) meydana gelir. MDA membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına yol açarak membran iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitelerinin değişmesine neden olur. Ayrıca kolay difüze olabildiği için DNA bazları ile rahatlıkla reaksiyona girerek mutajenik, genotoksik ve kanserojenik özellik gösterir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olup lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir (48,53,57). Lipid peroksidasyonunun bir diğer aldehit ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) olup mutajenik aktiviteye sahiptir (52).

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilmektedir. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Sitoplazmik ve membran proteinleri, çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan OH• radikalleri, peptit ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozararak denatürasyona, enzim inhibisyonlarına ya da proteolitik yıkıma neden olurlar (48,49).

Radikaller, özellikle OH•, DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazları ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyon girerek DNA bazlarını modifiye eder, baz delesyonlarına neden olur ve riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden mutasyonlara, karsinogenezise, yaşlanma veya hücre ölümüne neden olur (48,52). Hidroksillenmiş bileşiklerin, örneğin 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), timin glikol ve sitozin glikolün idrarda ölçümü endojen DNA hasarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır ve in vivo koşullarda OH•'in ne kadar üretildiği veya radyasyona ne kadar maruz kalındığı hakkında bilgi vermektedir (53).

Hidroksil radikali glukoz, mannitol ve deoksi şekerlerle doğrudan reaksiyona girer. Monosakkaritlerin oksidasyonuyla peroksitler, hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar yapma özelliğinden dolayı hücrede zararlı etkilere yol açarlar (48).

2.2.4. Serbest Radikal Kaynakları

Birçok hastalığın gelişiminde önemli role sahip serbest radikaller özellikle süperoksit radikali ve hidroksil radikali başta olmak üzere oksijen türleridir. Vücuttaki radikal oluşumu endojen (mitakondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları, otooksidasyon reaksiyonları) ve çevresel faktörler (çevre kirliliği, ultraviyole (UV) ışını, iyonize radyasyon, sigara kullanımı, ksenobiyotikler) olmak üzere çeşitli mekanizmalar nedeniyle gerçekleşmektedir (58).

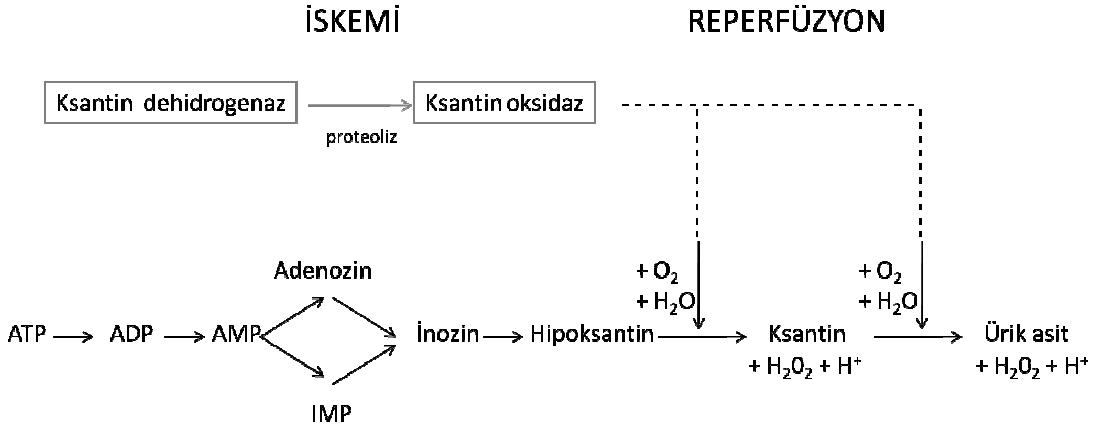
Serbest radikaller çoğunlukla mitokondrideki oksijenli solunum sırasında elektron transport sistemindeki elektron kaçakları nedeniyle oluşmaktadır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Bunun yanında birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasında ve çeşitli nedenlerle oluşan oksidatif stres durumlarında ortaya çıkmaktadır.

Ksantin oksidaz, triptofan deoksijenaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamino oksidaz gibi birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar.

Ksantin dehidrogenaz (XD) normal fizyolojik koşullarda bir dehidrojenaz olup, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden, ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarını katalizleyen ve elektron alıcısı olarak nikotinamid adenin dinükleotidin okside formunu (NAD^+) kullanan bir enzimdir.

Doku perfüzyonunun bozulduğu hipoksi/iskemi gibi patolojik durumlarda yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine yol açar. Hücre içinde azalan oksijen ve artan kalsiyum konsantrasyonu ile kalsiyum iyonları proteolize neden olarak yapısındaki sülfidril rezidülerin oksidasyonu ya da proteolizi sonucu ksantin dehidrogenaz bir oksidaz gibi aktivite gösterir. Böylece **ksantin oksidaz**ın kataliziyle hipoksantin, ksantine ve ksantin, ürik aside dönüşürken moleküler oksijen (O_2) kullanılmakta ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Dokunun tekrar kanlanmasıyla (reperfüzyon) fazla miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşur ve sonuçta iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Bu nedenle ksantin oksidoredüktaz hem antioksidan

molekül (ürik asit) hem de ROT/RNT üretimine neden olduğu için hücresel oksidasyon-redüksiyon potansiyelinde önemli bir role sahiptir (52,59,60,61).



Şekil 2.6: İskemi ve reperfüzyon olayı - Becker ve ark. (59)'dan alınmıştır.

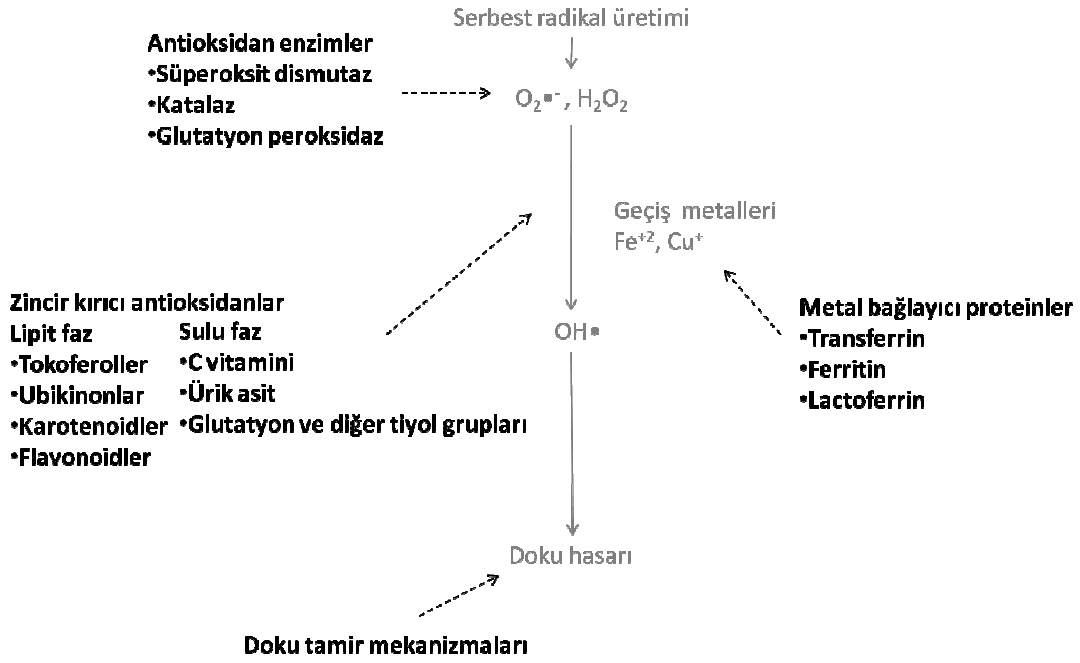
Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. membran ve sitoplazmalarında bulundurdukları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile ortaya çıkan hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi güçlü oksidanlar biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler.

Prostaglandinlerin sentez edildiği lipooksijenaz ve siklooksijenaz ana metabolik yollarında farklı basamaklarda serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Bunların dışında ayrıca tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler gibi bazı otooksidasyonu radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır (49,62).

Endojen reaksiyon kaynaklı serbest radikal oluşumu her ne kadar normal hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde önemli ise de çeşitli ekzojen nedenler de radikal üretimine neden olmaktadır. UV ışını deride singlet oksijen ve diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Ozon ve nitrojen dioksit gibi çevre kirliliğine yol açan ajanlar bronkoalveolar sıvıda radikal üretimine ve antioksidan baskılanmasına ve dolayısıyla şiddetli solunum yolları hastalıklarına sebep olmaktadır. Sigara birçok toksin ve milimolar miktarlarda serbest radikaller içermektedir. Çeşitli ksenobiyotikler ve parasetamol, bleomisin gibi ilaçlar serbest radikal üretiminin bir sonucu olarak doku hasarına neden olmaktadır (58).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Hücrede lipid, protein, DNA gibi bileşikler üzerine sitotoksik etkileri olan ve hücre ölümüne kadar götüren radikalik tepkimelerin sonlanması için oluşan radikallerin antioksidanlar tarafından indirgenmesi veya oluşumunun engellenmesi gereklidir. Antioksidanlar, bir substratın kısa süre içerisinde oksidasyonunu engelleyici ya da inhibe edici bileşiklerdir ve "antioksidan savunma sistemi" olarak da adlandırılırlar (63). İyi bir antioksidan serbest radikalleri ortadan kaldırmalı, metallerle redoks tepkimelerine girebilmeli, gen ekspresyonunu sağlamalı, diğer antioksidanlarla etkileşebilmeli, kolayca absorbe olmalı, dokularda ve biyolojik sıvılarda belirli bir konsantrasyonda bulunmalı ve hem hücrede hem de sulu ortamlarda işlev görebilmelidir (64).



Şekil 2.7: Serbest radikallere karşı antioksidan savunma sistemi. – Young ve ark. (58)'dan alınmıştır.

Antioksidan enzimler özellikle hücre içi ortamda serbest radikallerle reaksiyona girerek detoksifiye etmektedir. Geçiş metallerine bağlanan proteinler ise demir, bakır gibi geçiş metalleri ile hidrojen peroksit ve süperoksitin etkileşimini engellemektedir. Zincir kırıcı antioksidanlar, güçlü elektron vericileri olup hedef doku hasarlanmadan

önce serbest radikallerle reaksiyona girmektedir. Böylelikle okside olan antioksidanlar yenilenmeli veya yerine konmalıdır.

Antioksidan savunma mekanizmaları etkilerini dört ayrı şekilde gösterirler (58):

- Scavenging (temizleyici, toplayıcı) etkisi,
- Quencher (baskılayıcı) etkisi,
- Zincir kırıcı etki,
- Onarıcı etki.

Antioksidanlar yapılarına (enzim olan ve olmayan), yerleşimlerine (hücre içi ve hücre dışı), kaynaklarına (endojen ve ekzojen) ve etkilerine göre sınıflandırılabilirler.

2.3.1. Enzim Olan Antioksidanlar

2.3.1.1. Katalaz

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) yapısında dört tane protein alt ünitesi bulunan ve her bir grupta hem grubu ile NADPH içeren homotetramerik yapıda bir hemoproteindir ve peroksizom yerleşimlidir. Karaciğer ve eritrositlerde yüksek aktiviteye sahiptir.

Katalaz, hidrojen peroksidin, su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

H_2O_2 zayif bir redüktan olmakla birlikte oldukça güçlü bir oksidandır. Süperoksit dismutaz enziminin yaptığı gibi CAT da bir H_2O_2 kullanarak diğerini oksitlemektedir (58,65).

Normal koşullarda hücrede oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda esas olarak bir selenoenzim olan glutatyon peroksidaz enzimi rol almaktadır. CAT'ın ise hidrojen peroksit oluşumunun aşırı arttığı durumlarda önemli etkinliğinin olduğu kabul edilmektedir. Granulomatöz hücrelerde hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı korumaktadır.

2.3.1.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu antioksidan enzimdir. Sitozolde bulunur, tetramerik yapıdadır ve enzimin aktif bölgesinde dört adet selenyum atomu içerir.

Eritrositlerde ve diğer dokularda glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte formdaki glutatyon (GSH), hidrojen peroksit veya çeşitli hidro- veya lipid peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol alırken, GSH başka bir glutatyon molekülüyle disülfit köprüsü oluşturarak okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GS\text{-}SG + 2H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GS\text{-}SG + ROH + 2H_2O$$

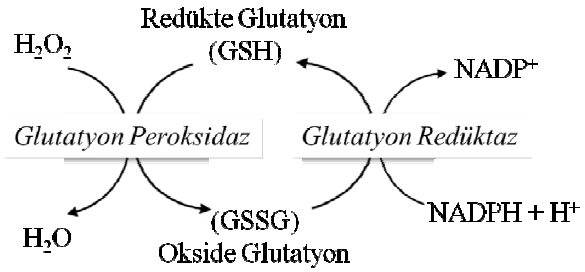
Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan GSSG, glutatyon redüktaz enzimi tarafından tekrar GSH formuna çevrilir.

Lipid peroksitlerinin su ve alkole parçalanması ile lipid peroksidasyonu engellenmiş olup böylece biyolojik membranların yapı ve fonksiyonu korunmaktadır.

2.3.1.3. Glutatyon Redüktaz

Hidroperoksitlerin indirgenmesi sırasında glutatyon okside olur. Hücre içerisinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun devamlılığı için okside glutatyonun redükte formuna geri dönüştürülmesi gerekir. NADPH'nın kullanıldığı bir reaksiyonla okside glutatyon, glutatyon redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2) enzimi ile tekrar redükte glutatyon formuna çevrilir.

$$GS\text{-}SG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$



Glutatyon hücrenin yükseltgenme-indirgenme dengesini koruyan önemli bir redüktan ve antioksidan olup, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır.

2.3.1.4. Glutatyon S-Transferazlar

Glutatyon S-transferazlar (GST) (EC 2.5.1.18) lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösteren, her biri iki alt birimden oluşmuş bir antioksidan enzim ailesidir.

$$LOOH + 2GSH \xrightarrow{GST} GS\text{-}SG + LOH + 2H_2O$$

GST multifonksiyonel bir protein olduğundan aynı zamanda bir transferaz gibi davranmakta, ksenobiyotikler ve reaktif moleküllerin konjugasyununu katalizleyen faz II detoksifikasyon reaksiyonlarında yer almaktadır (66).

2.3.1.5. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) süperoksit serbest radikalinin (O_2•), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir metaloenzim olup, endojen kaynaklı bir antioksidan enzimdir.

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

SOD tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonunda, süperoksitin hem oksidan hem de redüktan özelliğinden dolayı SOD enzimi bir süperoksidi diğerini okside etmek için kullanmaktadır (65). Hafif asidik koşullarda bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşmektedir. Ancak nötral pH'da enzimatik dismutasyon çok daha hızlı olduğundan süperoksidin etkilerinin ortadan kaldırılmasında önemli bir antioksidan enzimdir.

İnsan hücrelerinde SOD1 (Cu,Zn-SOD) sitozolik, SOD2 (Mn-SOD) mitokondriyal, SOD3 (EC-SOD) ekstraselüler yerleşimli olmak üzere üç izoenzimi vardır (67). Cu,Zn-SOD, intraselüler yerleşimli olup sitozolde bulunur. Homodimer yapıdadır. Enzimin aktif bölgesinde bulunan Cu enzimin katalitik aktivitesinden, Zn ise protein yapının stabilitesinden sorumludur. Mn-SOD, mitokondride bulunan, aktif

bölgesinde Mn içeren homotetramer yapılı, intraselüler yerleşimli bir antioksidan enzimdir. Enzimin promotor bölgesi NF-κB gibi transkripsiyon faktör bağlanan alan içermektedir. Hücre içi redoks durum değişikliklerinde, TNF-α, IL-1, IL-6, IFN-γ gibi inflamatuar sitokinlerin salınımıyla uyarılabilmektedir. EC-SOD ise tetramerik glikoprotein yapıda olup, ekstraselüler sıvılarda ve interstisyumda bulunmaktadır. Heparin, heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlara ilgisi yüksektir ve salınımı sitokinlerle düzenlenmektedir. Enzim aktif bölgesinde Cu ve Zn içermektedir (64,68).

Mn-SOD mitokondri yerleşimli olması nedeniyle mitokondride oluşan serbest radikallere karşı önemli bir antioksidan savunma sistemidir. Ayrıca antitümör etkiye sahip bir antioksidan enzimdir Enzimi kodlayan gen 6. kromozom üzerinde olup, düşük ekspresyonları değişik tipte kanser oluşumlarıyla ilişkilendirilmektedir. Bunun yanında ekspesyonunun fazla olduğu durumlarda bir tümor supresyon geni şeklinde davrandığı ve kanser gelişimini inhibe ettiği düşünülmektedir (69).

Cu-Zn SOD'ın spesifik aktivitesi Down sendromlu (DS) hastaların eritrositlerinde yüksek bulunmuştur. SOD1'i kodlayan gen 21. kromozom üzerinde olup DS'da oldukça fazla eksprese edilmektedir (70). Ayrıca psöriazis hastalarının polimorfonükleer lökositlerinde azalmış SOD aktivitesi bulunmaktadır.

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücrelerde süperoksit radikalinin diğer serbest radikallerin üretimini engellemek, hücreyi lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı fazla olan dokularda aktivitesi fazladır.

2.3.1.6. Sitokrom Oksidaz

Sitokrom oksidaz yapısında bakır içeren mitokondride elektron transport zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder.

$$4O_2^{\bullet -} + 4H^{+} + 4e^{-} \xrightarrow{\text{Sitokrom oksidaz}} 2H_2O$$

2.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

2.3.2.1. E Vitamini

Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini α-, β-, γ-, δ-tokoferol ve α-, β-, γ-, δ-tokotrienol olmak üzere sekiz farklı yapıdadır. İnsanda α –tokoferol en aktif form olup en yüksek antioksidan güce sahiptir. Bitkisel yağlar ve tohumlar E vitamini bakımından zengin kaynaklardır.

Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruduğundan önemli bir antioksidan olarak kabul edilir. E vitamini süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirgeyerek oluşumunu engeller ya da ortamdan temizler. Bu özelliğinden dolayı E vitamini *zincir kırıcı antioksidan* olarak bilinir. Ayrıca lipid peroksidasyonundaki zincir reaksiyonlarında tepkimeler E vitamininin reaksiyona girmesiyle sonlandırılabilir. Düşük yoğunluklu lipoproteinini (LDL) oksidasyona karşı korur.

α-tokoferol, tokoferoller içerisinde en güçlü antioksidan molekül olup hızlıca peroksil radikaliyle tepkimeye girerek nispeten daha kararlı tokoferoksil radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu radikal çeşitli reaksiyonlara katılarak ortamdan temizlenmektedir. E vitamini okside olduktan sonra askorbik asit, glutatyon veya ürat tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Diğer alternatif yolar ise iki tokoferoksil radikalinin birleşerek bir dimer oluşturması ya da tokoferol kuinon oluşturmak üzere radikalin okside olmasıdır.

Glutatyon peroksidaz enzimi oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin sentezini engellediğinden glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler.

E vitamininin antioksidan aktivitesine ek olarak membranları stabilize edici özelliği de bulunmaktadır (58).

2.3.2.2. Karotenoidler

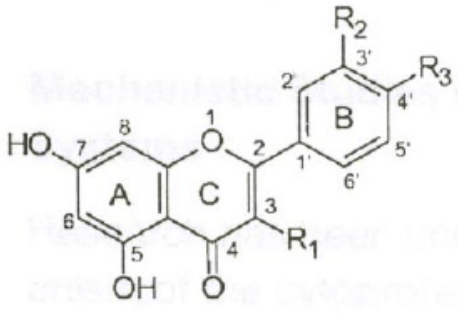
Karotenoidler (CAR), çeşitli bitki ve mikroorganizmalarda pigment olarak bulunan tetraterpenoidlerdir. Doğada 600 üzerinde karotenoid çeşidi vardır. Kimyasal yapılarına göre ksantofiller ve karotenler olarak iki sınıfa ayrılırlar. α- ve β-karoten ile likopen karoten grubunun temel elemanlarıdır.

Karotenoidler yağda çözünen antioksidanlar olup yapısında izoprenoid karbon iskeletine sahiptir. Karotenoidler, singlet oksijeni baskılayıcı özellikte olup, düşük oksijen basıncında peroksil radikaliyle reaksiyona girmektedir. İn vivo lipid peroksidasyonunu engellemektedirler. Radikal eklenmesi, karotenoidten hidrojen çıkarılması ve elektron transfer reaksiyonları gibi mekanizmalarla serbest radikallerle tepkimeye girerler. Ayrıca karotenoidler aynı zamanda bir antioksidan olan A vitamininin (retinol) öncülüdür (49,58,64).

2.3.2.3. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenol bileşikleri içerisinde yer alan ve heterosiklik piron veya piran halkası yardımıyla birleşmiş iki benzen halkasından oluşan yapılardır. Kimyasal yapılarına göre flavonoidler, flavonol (quercetin, kaemferol), flavanol (kateşinler), flavon (apigenin) ve isoflavon (genistein) olarak gruplandırılmaktadır.

Flavonoidler radikalik zincir reaksiyonlarını sonlandırıcı özelliktedir ve peroksil radikallerini temizlediğinden lipid peroksidasyonunu da inhibe eder. Ayrıca metal iyonlarıyla şelat yapması nedeniyle oksidatif strese karşı koruyucudur (58).



Şekil 2.8: Flavonoidlerin yapısı

Yapısındaki dihidroksile B halkası ve C halkasında 2,3 konumundaki doymamış yapının sayesinde hidrojen verdiğinden antioksidan özellik gösterir. Ayrıca A, B ve C halkalarındaki hidroksil gruplarının varlığına bağlı olarak geçiş metalleri ile şelasyon yapabilmektedir (71).

2.3.2.4. Ubikinonlar

Ubikinonlar (UQ), yağda çözünen zincir kırıcı antioksidan moleküldür ve elektron transport zincirinde görev almaktadır. İnsanda bulunan temel UQ yapısı ubikinon 10 (koenzim Q)'dur. α-tokoferolden daha düşük konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen lipid peroksillerini temizleyici özelliğe sahiptir (58,72).

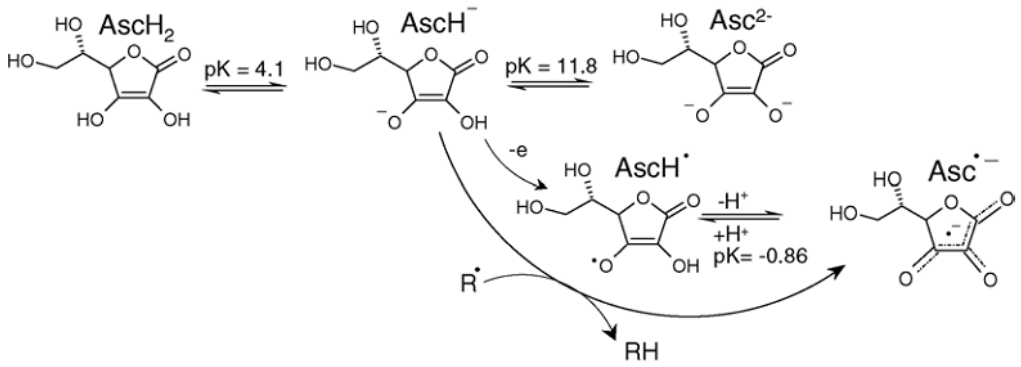
2.3.2.5. C Vitamini

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini (askorbik asit) organizmanın pek çok metabolik fonksiyonu için gerekli bir moleküldür. İnsanlarda C vitamini sentezindeki enzim olmadığından diyetle alınması gereklidir.

C vitamini organizmada birçok enzimin kofaktörü olup, hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar. Böylece kollajen, karnitin ve nörotransmiterlerin biyosentezinde rol alır. Ayrıca demir alımının düzenleyicisi olup enzimatik olmayan bir yol ile ferrik demir iyonlarını (Fe^{+3}) ferröz demir (Fe^{+2}) iyonlarına indirgeyerek demir emilimini kolaylaştırır.

C vitamini ayrıca sulu fazda bulunan zincir kırıcı güçlü antioksidan yapı olup süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipokloröz asit, singlet oksijeni ortamdan temizlemektedir. Ayrıca E vitamini, karotenoidler ve antioksidan enzimlerle ko-antioksidan olarak davranmaktadır. C vitamini, E vitaminiyle birlikte hücre zarında ve lipoproteinlerde oluşan α-tokoferol radikallerinden yeniden α-tokoferol oluşumunu sağlar.

Askorbik asit iki iyonize hidroksil gruba sahip olan bir diasittir ($AscH_2$). Fizyolojik pH'da C vitamininin çok büyük bir oranı $AscH^-$ şekilde bulunurken, çok küçük oranlarda $AscH_2$ ve Asc^{-2} şeklindedir. $AscH^-$, C vitamininin antioksidan kimyasından sorumlu olup, radikallerle reaksiyona girerek sırasıyla AscH• radikali, kararlı bir yapı ve düşük reaktiviteye sahip $Asc^{\bullet-}$ oluşmaktadır.



Şekil 2.9: Askorbik Asitin Çeşitli Formları ve Radikalle (R•) Reaksiyonu – Valko ve ark. (64)'dan alınmıştır.

Yapılan çeşitli in vitro ve hayvan deneyi çalışmalarında hücrelerden metal iyonlarının salınımına bağlı olarak C vitamininin prooksidan özellik gösterdiği ve ayrıca lipid hidroperoksitlerini genotoksik elektofillere dönüştüren bir mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmanın in vivo geçerliliği kanıtlanmamıştır.

C vitamini, ayrıca antiapoptotik etkiye sahip olup çeşitli gen ekspresyonu yapmaktadır (58,64).

2.3.2.6. Glutatyon

Glutatyon (GSH), tripeptid yapıda ve tiyol içeren multifonksiyonel hücre içi antioksidandır. Hücrenin temel tiyol-disülfit redoks tamponu olarak kabul edilmektedir. Sitozol, çekirdek ve mitokondride çözünmüş halde bulunan bir antioksidandır. Tiyol bileşiklerinin antioksidan kapasitesi yapılarındaki sülfür atomuyla ilişkilendirilmektedir. Glutatyon, bir radikal (R•) ile reaksiyona girdiğinde

oluşan tiyol radikali (GS•) dimerize olarak okside glutatyonu (GSSG) meydana getirir.

$$GSH + R^{\bullet} \rightarrow GS^{\bullet} + RH$$
$$GS^{\bullet} + GS^{\bullet} \rightarrow GSSG$$

Oksidatif strese karşı glutatyonun koruyucu etki mekanizmaları:

- Glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz gibi detoksifiye edici enzimlerin kofaktörüdür.
- Amino asitlerin membranlardan transportunu sağlar.
- Hidroksil radikalini ve singlet oksijeni direkt temizler, GSH-Px enziminin katalitik aktivitesi ile hidrojen peroksit ve lipid peroksitleini detoksifiye eder.
- C ve E vitaminlerinin aktif formlarına dönüşümünü sağlar.
- Hücresel oksidasyon-redüksiyon dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan tiyol proteinleriyle etkileşime girer.
- Proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

Ayrıca glutatyon NF-κB ve aktivatör protein AP-1 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerin aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Multifaktöriyel mekanizmalar tarafından hücreyi apopitoza karşı korur (64).

2.3.2.7. Albümin

Albümin, metal iyonları, yağ asitleri, kolesterol, safra pigmentleri ve ilaçlar ile bağlanarak taşıma gibi birçok fizyolojik ve farmakolojik fonksiyona sahip en önemli plazma proteinidir. Albüminin birçok antioksidan aktivitesi ligand bağlama kapasitesinin bir sonucudur. İnsan serum albumini yapısındaki disülfit köprüleri ve indirgenmiş sistein kalıntıları (Cys34) bulunduğundan hidroksil radikallerini ortamdan temizlemektedir. Ayrıca aktive fagositler tarafından myeloperoksidaz enziminin kataliziyle oluşan HOCl'i temizlemektedir. Bakır bağlama kapasitesi sayesinde bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu ve hidroksil radikali oluşumunu engellemektedir (58,73).

2.3.2.8. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin), triptofandan sentezlenen önemli fizyolojik ve nöroendokrin fonksiyonlara sahip bir pineal hormondur. Aynı zamanda melatonin güçlü bir antioksidan olup reaktif oksijen/nitrojen türlerini ortamdan temizlerken antioksidan savunma sisteminin de aktivitesini artırır. OH•, H_2O_2, singlet oksijeni ortadan kaldırır, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipofilik yapıda olduğundan hücrede membrandan çekirdeğe kadar geniş bir alanda aktivite gösterir. SOD, CAT, GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini ve hücre içi glutatyon düzeylerini artırır (74).

2.3.2.9. Ürik Asit

Ürik asit, enzimatik purin katabolizmasının insanlardaki son ürünü olup, ksantin dehidrogenaz enziminin kataliziyle ksantinin oksidasyonu sonucu oluşur. Plazma konsantrasyonu (150-450 μM) diğer birçok endojen antioksidan moleküllerden daha fazladır. Elektron spin rezonans ve kimyasal çalışmalar, ürik asitin OH ve HOCl ile in vitro reaksiyona girebildiği gösterilmiştir (75). Ürik asit plazma antioksidan kapasitenin % 60'ını oluşturmakta olup antioksidan aktivitesini serbest radikallerle (süperoksit, hidroksil, peroksi radikalleri ve singlet oksijen) doğrudan reaksiyona girerek ya da demir gibi geçiş metal iyonlarıyla kararlı bileşikler oluşturarak sağlamaktadır. Böylece askorbat oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonunu önlemektedir (76).

2.3.2.10. Bilirubin

Bilirubinin moleküler yapısında konjuge çift bağ ve bir çift reaktif hidrojen atomu yer almaktadır. Antioksidan aktivitesi bir başlangıç radikaline H verme üzerinden gerçekleşir. Örneğin lipid peroksil radikalinin (LOO•) bilirubin ile reaksiyona girmesiyle lipid peroksit (LOOH) ve bilirubin radikali oluşur. Ayrıca konjuge olmayan bilirubin singlet oksijeni ortamdan temizlerken, peroksidazlar için

indirgeyici ajandır. Bunun yanında bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (77).

2.3.2.11. Seruloplazmin

Seruloplazmin bakır bağlayıcı ana protein olup, ferröz demiri (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

2.3.2.12. Ferritin, Transferrin ve Laktoferrin

Ferritin dokudaki demiri bağlarken transferrin ve laktoferrin ise dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

2.3.2.13. Haptoglobulin-Hemopeksin

Hem proteinlerini bağlayarak bu bileşiklerin etkinliğini azaltır.

2.3.2.14. Antioksidan etkisi olan ilaçlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurınol), rekombinan h-SOD, sitokinler (TNF, IL-1), mannitol, ebselen, demir şelatörleri (deferroksamin, dimetil tiyoüre), H2 reseptör blokerleri (47).

2.4. Tatlandırıcılar

Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC) tarafından "gıdaya tatlı tadı veren ve şeker olmayan madde" olarak tanımlanan tatlandırıcılar, şekerden daha fazla tat verir ancak daha az enerji içerirler. Günümüzde tatlandırıcılar ve tatlandırıcı içeren gıdalar, diyabetik ve metabolik bozuklukları olan kişilerin yanında vücut ağırlığını dengelemek isteyen kişiler tarafından da yoğun bir şekilde tüketilmektedir.

Tatlandırıcı niteliğindeki maddelerin elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırıldığında genellikle bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler "doğal tatlandırıcı", sentezleme yoluyla elde edilen ve doğal maddelerle benzerliği bulunmayanlar ise "yapay tatlandırıcı" olarak adlandırılmaktadır.

Sakarin, siklamat, aspartam, asesulfame-K, neohisperidin, alitam, sukraloz yapay tatlandırıcılardır. Sakarin bilimsel araştırmaların üzerinde yoğunlaştığı, en fazla tartışılan, ilk tanımlanmış yapay tatlandırıcıdır. Ratlar üzerinde yapılan toksisite araştırmalarında en belirgin bulgu, sakarinle mesane kanseri arasında ilişki bulunmasıdır. Besin maddelerinin içerisinde sıklıkla bulunan ve bazı ülkelerde kullanımı yasaklanan siklamatın da çeşitli kanser türlerini tetiklediğini gösterilmiştir. Diğer bir yapay tatlandırıcı olan aspartam, aspartik asit, fenil alanin ve metanole metabolize olmaktadır. Birçok üründe tatlandırıcı olarak kullanılması, stabilitesinin pH, sıcaklık ve nem gibi faktörlerden etkilenmesi nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır. Ayrıca fenilalanine metabolize olduğundan fenilketonüri hastaları kesinlikle kullanmamalıdır. İzin verildiği sınırlarda kullanıldığında toksikolojik açıdan bir sakıncası olmamasına karşın bazı çalışmalarda aspartamın beyin tümörü riskini artırdığı saptanmıştır. Her ne kadar yapay tatlandırıcıların önerilen doz sınırları içerisinde kullanıldığında güvenilir oldukları düşünülüyorsa da diğer bir taraftan da günümüzde doğal ürünlerin tercih edilmesinden dolayı, doğal ve düşük kalorili, tatlandırıcı özellikli ürünlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır (1,78).

Tatlandırıcı etkisi bilinen en eski madde şeker grubundaki sukroz olup, glukoz, fruktoz, hidrolize nişasta şurupları ve yüksek fruktozlu mısır şurupları da tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır. Ayrıca doğal tatlandırıcı grubuna giren polioller (sorbitol, ksilitol gibi) genellikle toksikolojik açıdan gıdalardaki miktarları sınırlandırılmayan maddelerdir. Ancak bu maddelerin, bazı durumlarda aşırı tüketilmeleri diyare, gaz oluşumu ve abdominal distansiyona neden olabilir.

İçecek ve gıdalarda şekerin yerine besleyici olmayan tatlandırıcıların, “non-nutritive sweeteners”, kullanımı gıda teknolojisine yeni bir çeşitlilik getirmiştir. Yapılan bir çalışmada, şeker yerine kullanılan bu alternatiflere olan gereksinimin yıllık % 8 oranında arttığı bildirilmiştir. Düşük kalorili ya da kalorisiz olması, dayanıklı olması, yoğun tatlandırıcı özelliği, ağız ve diş problemlerini engellemesi nedeniyle birçok ülkede sukroz yerine kullanımı tercih edilmektedir (79).

2.5. Diabetes Mellitus, Komplikasyonları ve Serbest Radikaller Arasındaki İlişki

Diabetes Mellitus (DM), insulinin kısmen veya tamamen eksik ve/veya etkisiz olması sonucu vücutta glukozun yetersiz kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan kronik hiperglisemi ile karakterize, yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle morbiditesi ve mortalitesi yüksek kronik metabolik bir hastalıktır.

Tip 1 DM, pankreasın β-hücrelerinin hücresel aracılı otoimmun yıkımı sonucu gelişir. Erken yaşlarda, poliüri, polidipsi, hızlı kilo kaybı ve ketoasidoz gibi semptomlarla başlar. Hiperglisemi, ketoasidoz ve diabetik komplikasyonları önlemek için insulin tedavisi gerekir.

Tip 2 DM, β-hücrelerinden insulin sekresyonunda veya insulinin etkilerinde meydana gelen bir bozukluk sonucu ortaya çıkar. İnsulin metabolizmasındaki anormalliğe ek olarak pankreatik α-hücre disfonksiyonu ve relatif glukagon artışı meydana gelmektedir. Tip 2 diabetlilerde gözlenen postprandiyal hiperglisemi, bazal hepatik glukoz üretiminde artış ve periferik glukoz kullanımında azalmaya bağlı olarak gelişir. Bu nedenle plazma glukozundaki bu dengesizliğin düzeltilmesi ile bu patolojik durumun gelişimini önleyebilmektedir (2). Ancak ortaya çıkan glukoz toksisitesi birçok hücre ve dokuda oksidatif stresi tetiklemekte ve gelişen bu oksidatif hasar nefropati, retinopati, kardiovasküler hastalıklar gibi diabetin komplikasyonlarının gelişiminde önemli rol oynamaktadır (80).

Diabetin kronik komplikasyonları olup arasında retinopati ve nefropati, koroner kalp hastalığı, kardiomyopati, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, nöropati ve katarakt bulunmaktadır ve bunlar hastaların morbidite ve mortalitesi ile yakından ilişkilidir. Bu komplikasyonların ortaya çıkmasında uzun süreli hiperglisemi ve azalmış insulin direnci ile bunlarla ilişkili birçok mekanizma öne sürülmektedir (81).

Pankreatik adacık hücrelerinin oldukça zayıf antioksidan enzim yanıtı nedeniyle diğer doku ve organlara göre oksidatif strese daha duyarlıdır. Bu nedenle glukoz toksisitesinin temel nedeni olan azalmış insulin biyosentezi ve sekresyonunun moleküler mekanizmasının oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (82).

Hiperglisemi glukoz oksidasyonu, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumu, poliol yolu aktivasyonu gibi çeşitli biyokimyasal yolakları etkilemekte ve ROT ve RNT oluşumunu uyarmaktadır. Glukozun proteinlere enzimatik olmayan tepkime (glikasyon) sonucu bağlanması ile 'Schiff' bazı oluşur. Başlayan Mailard tepkimelerinde oluşan Amadori ürünleri ve AGE bileşikleri vasküler doku hasarına yol açmakta ve ROT üretimine neden olmaktadır. Ayrıca hiperglisemiye bağlı olarak mitokondrideki elektron transfer zinciri tepkimeleriyle süperoksit üretimi artmaktadır. Bunun yanında poliol yolunun aktivasyonu ile artmış $NADH/NAD^+$ oranı glikasyonu ve diaçilgliserol (DAG) sentezini artırırken $NADPH/NADP^+$ oranı azalmaktadır. Artan DAG sentezi protein kinaz C aktivasyonuna neden olarak vasküler doku hasarını tetiklemektedir. NADPH tüketimi sonucu bu kofaktörü kullanan diğer enzimlerin aktivitesinde inhibisyon gerçekleşir (81,82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada yaklaşık 200±15 g ağırlığında 26 adet yetişkin dişi Wistar ırkı albino rat (sıçan) kullanıldı. Ratlar, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, 22±2ºC sıcaklıkta odalarda ve standart kafeslerde barındırıldı. Standart rat yemi ve çeşme suyu ile serbest beslenmeleri sağlandı.

Deney hayvanları kontrol (n=10) ve deney grubu (n=16) şekilde iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup 1) bir ay boyunca yalnızca standart rat yemiyle beslenirken, deney grubu (Grup 2) da bir ay boyunca standart rat yemine ilave olarak 22 mg stevia özütü[1]/gün olacak şekilde içeriğinde stevia özütü bulunan ve ticari olarak satılan bir tatlandırıcı orogastrik lavaj yoluyla verildi. Çalışma sonunda ketamin anestezisi altında ratların aort damarından kan örnekleri alındıktan sonra ratlar sakrifiye (kurban) edilerek karaciğer dokuları çıkarıldı. Çıkarılan karaciğer dokusunun bir kısmı formaldehit solüsyonu içine konarak histopatolojik inceleme için ayrılırken, diğer kısmı oksidan ve antioksidan parametrelerin ölçümü ile DNA ekstraksiyonu için -85ºC sıcaklıkta derin dondurucuda saklandı. Kan örnekleri 5 dakika boyunca 4ºC'de 3500 x g devirde santrifüj edilerek serum ayrıldı ve biyokimyasal parametreler çalışılmak üzere -85ºC sıcaklıkta derin dondurucuda saklandı.

Çalışma günü derin dondurucudan çıkarılan karaciğer dokuları çözüldükten sonra ağırlıklarının 5 katı hacimde (% 20 w/v) serum fizyolojik içinde homojenize edildi. Doku homojenatları 4000 x g'de 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanlarda protein konsantrasyonu Lowry yöntemiyle belirlendi ve uygun seyreltmelerle tüm süpernatanların protein konsantrasyonları eşitlendi. Bu süpernatanlarda oksidan ve antioksidan parametreler ölçüldü.

[1] 1 poşet (1gr) inde 22 mg stevia özütü ve 978mg Hindiba kökü özütü içeren, ticari olarak satılan bir tatlandırıcıdır ve Stevia özütü %95 oranında steviosid aktif maddesini içermektedir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sigma, Merck, Fischer, Fluka, Genoks (FC Biotek) firmalarından temin edilmiştir.

3.2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Derin dondurucu (-85ºC)	Sanyo
Soğutucu (+4ºC)	Arçelik
Hassas elektronik tartı	Sartorius Basic
Homojenizatör	B.Braun Melsungen
Santrifüj	Heraus (Labofur 200 model)
Spektrofotometre	Unicam (Heλios-α model)
Ayarlanabilir ve sabit otomatik pipetler	
Cam pipetler	
Mikroskop	Nikon Eclipse E 600
Otoanalizör	COBAS Integra 400 plus

3.3. Protein Düzeyi Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi)

Doku homojenatlarından elde edilen süpernatanların protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Lowry'nin protein ölçüm yöntemi kullanıldı (83). Bu yöntem, fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin Cu^{+2}-protein kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından molibden mavisi ve tungsten mavisi oluşturması prensibine dayanır. Oluşan kompleksin absorbansı 700 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür ve sonuç protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Protein ölçümünde kullanılan reaktiflerin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

- A reaktifi: 0,5 g $CuSO_4.5H_2O$ ve 1 g sodyum sitrat 100 ml distile suda çözülür.
- B reaktifi: 20 g Na_2CO_3 1 L 0,1 N NaOH içinde çözülür.
- C reaktifi: 50 ml B reaktifine 1 ml A reaktifi eklenir.

- D reaktifi: 10 ml Folin-Ciocelteau reaktifine 10 ml distile su eklenir.
- Folin-Ciocelteau Fenol reaktifi: 100 g sodyum tungstat (Na_2WO_4-$2H_2O$) ve 25 g sodyum molibdat ($Na_2MoO_4.2H_2O$) 700 ml distile suda çözülür. Üzerine 50 ml % 85'lik *o*-fosforik asit ve 100 ml derişik HCl eklenir. 10 saat süreyle hafif ateş altında reflux aparatında kaynatılır. 150 g lityum sülfat (Li_2SO_4) ve 50 ml H_2O eklenerek 3 damla brom damlatılır. Karışım 15 dakika süreyle kondenser (yoğunlaştırıcı) olmadan kaynatılır. Soğuyunca distile suyla 1 litreye tamamlanır.

  Deneyin yapılışı aşağıdaki protokolde belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi Protokolü

	NUMUNE	**KÖR**
SÜPERNATAN	10 µl	-
DİSTİLE SU	490 µl	500 µl
C REAKTİFİ	2,5 ml	2,5 ml

Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra kör ve numune tüplerine 250 µl D reaktifi eklenir. Oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübe edildikten sonra 700 nm dalga boyunda kör ve numunenin absorbansı (optik dansite, OD) distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Protein konsantrasyonunun hesaplanması için albumin standartından yararlanılmıştır. Buna göre faktör değeri 20 alınarak protein konsantrasyonu hesabı aşağıdaki formülle yapılmıştır.

Protein konsantrasyonu (mg/ml) = (OD_{Nm} - $OD_{Kör}$) x Faktör (F)

3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri

3.4.1. Malondialdehit Düzeyi Ölçüm Yöntemi

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olup oksidasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır. MDA ölçümünün temeli MDA ile

tiyobarbitürik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır (84). MDA dışındaki bazı maddeler de bu reaksiyonu verebildiği için bu yöntemdeki sonuçlar TBA ile reaksiyona giren maddeler (*substances*) anlamında kullanılan TBARS olarak adlandırılmaktadır.

MDA ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

- Etil alkol (% 95'lik, v/v) (Merck)
- Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 (Fischer) ile 11,56 g KH_2PO_4 (Merck) tartılıp distile suda çözülüp hacim 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.
- Trikloroasetik asit (TCA) (% 20 w/v): 100 g katı TCA (Merck) tartılıp 500 ml 0,6 N HCl'de (Merck) çözülür.
- TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg TBA (Sigma) tartılıp 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı aşağıdaki protokolde belirtilmiştir.

Tablo 3.2: MDA Düzeyi Ölçüm Yöntemi Protokolü

	NUMUNE	**KÖR**
SÜPERNATAN	200 µl	200 µl
ETİL ALKOL	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 20 dakika süreyle 6000 x g santrifüj edilir. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu çalışmada F değeri 80,65 alınmıştır.

$$MDA\ (nmol/mg) = (OD_{Nm} - OD_{Kör}) \times F / C_{protein}$$

3.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin SOD enzimi tarafından ortadan kaldırılamadığında ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi temeline dayanır (85). İndirgenmiş NBT 560 nm dalga boyunda en uygun absorbansı veren menekşe rengi oluşumuna neden olur. Ortamda SOD aktivitesi varlığında bu renk oluşumu önlenecektir. Buna göre SOD enzim aktivitesi (1 U), NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

SOD aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

- Reaktif 1:
  - Ksantin (Sigma) 9,1 mg tartılıp toplam hacim 200 ml olacak şekilde distile suda birkaç damla 1 N NaOH ile çözülür.
  - NBT (Sigma) 12,3 mg tartılıp distile su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde çözülür.
  - EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) (Merck) 25 mg tartılıp distile su ile toplam hacim 60 ml olacak şekilde çözülür.
  - Bovin (sığır) albumin (Sigma) 30 mg tartılıp distile su ile toplam hacim 30 ml olacak şekilde çözülür.
- Ksantin oksidaz (XO) çözeltisi: 10 µl XO (Sigma) 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta (Merck) çözülür.
- $CuCl_2$ çözeltisi: 108 mg $CuCl_2$ (Merck) tartılıp 100 ml distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı aşağıdaki protokolde belirtilmiştir.

Tablo 3.3: SOD Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü

	NUMUNE	KÖR
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATAN	100 µl	-
XO	50 µl	50 µl
Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek aşağıdaki şekilde devam edilir.		
$CuCl_2$	100 µl	100 µl
SÜPERNATAN	-	100 µl

Numune ve körün absorbansları 560 nm dalga boyunda distile suya karşı spektrofotometreyle ölçülür. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konarak SOD aktivitesi hesaplanır. Bu çalışmada F değeri 20 alınmıştır.

SOD aktivitesi (U/mg) = $[(OD_{Kör}-OD_{Nm}) / OD_{Kör}] \times F \times$ seyreltme faktörü / $C_{protein}$

3.4.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem CAT enzimi tarafından kataliz edilen reaksiyon sırasında hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerinin azalma göstermesi ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak takip edilmesi temeline dayanır (86). Absorbans değerindeki dakikalık azalma hızı enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır.

CAT aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

- Fosfat tamponu (pH 7; 50 mM): 4,2 g Na_2HPO_4 tartılarak 600 ml distile suda çözülür ve 2,72 g KH_2PO_4 tartılarak 400 ml distile suda çözülerek karıştırılır.
- H_2O_2 çözeltisi: H_2O_2 (Merck) stok çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınıp 100 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) ile seyreltilerek elde edilir.

Deney, kuartz küvete 3 ml H_2O_2 çözeltisi ve 10 µl süpernatan konularak distile suya karşı 240 nm dalga boyunda absorbansın bir dakika izlenmesi protokolüne göre gerçekleştirilir. Bir dakikanın sonundaki absorbans farkı (ΔOD) ve H_2O_2'in molar

absorbsiyon katsayısı kullanılarak CAT aktivitesi hesaplanır. CAT enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanır. F değeri bu çalışmada 7320 alınmıştır.

CAT aktivitesi (IU/mg) = (ΔOD/dk.) x F / $C_{protein}$

3.4.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem GSH (indirgenmiş glutatyon) ile H_2O_2'in GSH-Px enziminin etkisiyle su ve GSSG'e (yükseltgenmiş glutatyon) çevrilmesini takiben GSH redüktaz enziminin GSSG miktarına bağlı olarak NADPH'i okside etmesi temeline dayanır (87). Reaksiyonda GSSG oluştuğu sürece NADPH yükseltgenerek NADP'ye dönüşür. Spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda NADPH absorbansının düşmesinin takibiyle GSH-Px aktivitesi belirlenir.

GSH-Px aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

- Fosfat Tamponu (pH 7; 50 mM fosfat; 5,6 mM EDTA): 4,2 gr Na_2HPO_4 ile 2,72 gr KH_2PO_4 ve 2,08 gr EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) 1 litre distile suda çözülülerek hazırlanır.
- GSH çözeltisi: 250 mg katı GSH (Sigma) 5 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır.
- NADPH çözeltisi: 15 mg katı NADPH (Sigma) tartılıp 2,5 ml fosfat tamponunda çözülür.
- GSH Redüktaz çözeltisi: GSH Redüktaz enzim çözeltisinden (Sigma) 10 µl alınıp 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta seyreltilir.
- Sodyum azid çözeltisi: 65 mg sodyum azid (Merck) tartılıp 5 ml fosfat tamponunda çözülür.
- H_2O_2 çözeltisi: H_2O_2 stok çözeltisinden (% 30 v/v) (Merck) 15 µl alınıp 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

  Deneyin yapılışı aşağıdaki protokolde belirtilmiştir.

Tablo 3.4: GSH-Px Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü

FOSFAT TAMPONU	2,7 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
SÜPERNATAN	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyunda fosfat tamponuyla sıfırlanır, maddeler yukarıda belirtildiği miktarlarda kuartz küvete konulur ve bir dakika süreyle absorbans izlenir. Elde edilen sonuç kör değeridir. Aynı küvete 100 µl H_2O_2 eklenip bir dakika daha izlenir ve elde edilen sonuç numune değeri olur. Bu iki değer arasındaki fark (ΔOD) GSH-Px aktivitesiyle doğru orantılıdır. Enzimin aktivitesinin hesaplanmasında ΔOD ve NADPH'ın molar absorpsiyon katsayısı kullanılır. GSH-Px aktivitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapılır. F değeri bu çalışmada 4,8 alınmıştır.

GSH-Px aktivitesi (IU/mg) = (ΔOD/dk.) x F / $C_{protein}$

3.4.5. Ksantin Oksidaz (XO) Enzim Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi

Bu yöntem ksantinden ksantin oksidaz enzimi yardımıyla ürik asit oluşumu ve oluşan ürik asitin 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (88). Oluşan ürik asitin absorbansı XO aktivitesiyle doğru orantılıdır.

XO aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

- Fosfat tamponu (pH 7,5; 50 mM fosfat; 0,5 mM EDTA): 0,5 gr KH_2PO_4, 3 gr Na_2HPO_4 ve 93 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) tartılıp distile suda çözülerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.
- Ksantin çözeltisi (2 mM): 7,6 mg katı ksantin 25 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır.

Deneyin yapılışı aşağıdaki protokolde belirtilmiştir.

Tablo 3.5: XO Aktivitesinin Ölçüm Yöntemi Protokolü

FOSFAT TAMPONU	2,8 ml
KSANTİN ÇÖZELTİSİ	0,1 ml
SÜPERNATAN	0,1 ml

Deney tüpündeki çözeltinin absorbansı 293 nm dalga boyunda kuartz küvet kullanılarak distile suya karşı ölçülür. Çözeltiler oda sıcaklığında inkübe edilerek absorbansları bir saat sonra tekrar ölçülür. Ölçüm değerleri arasındaki fark (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak XO enzim aktivitesi hesaplanır. XO aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır. Bu çalışmada F değeri 3000 alınmıştır.

XO aktivitesi (mIU/mg) = (ΔOD/dakika) x F / $C_{protein}$

3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

Serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), gama-glutamiltransferaz (GGT) aktiviteleri ve C reaktif protein (CRP) düzeyleri kit kullanılarak S.B. Ankara Numune Hastanesi Araştırma Laboratuvarında çalışıldı.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Çıkarılan karaciğer dokuları tamponlanmış % 10'luk formaldehit solüsyonunda 5 gün süreyle tespit edildi. Akan su ile yıkanan dokular artan konsantrasyonlarda sırasıyla % 50, % 75, % 96, % 100'lük alkolden geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında ksilol ile şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Tüm karaciğer doku örneklerinden 4 μm kalınlığındaki histolojik kesitler alınarak hematoksilen ve eozin boyaları ile boyandı. Hazırlanan preperatlar Nikon Eclipse E 600 ile incelenerek

fotoğraflandı. Numunelerin histopatolojik incelemesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.7. Doku DNA Esktraksiyonu

Karaciğer dokusunda DNA ekstraksiyonu ve jel elektroforezi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında kit (Genoks) kullanılarak yapıldı.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bulguların istatistiksel analizi SPSS for Windows paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel değerlendirme amacıyla normal dağılıma sahip değişkenlerin karşılaştırılması Student-t testi ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak veriler ortalama ± standart sapma (Ort. ± SD) şeklinde verildi. Normal dağılmayan değişkenlerin karşılaştırılması ise Mann Whitney U testi ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak ortanca (min-maks) verildi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada kontrol grubu (n=10) ve stevia özütü alan deney grubu (n=16) olmak üzere toplam 26 rat kullanılmıştır. Çalışma süresince hayvanlarda herhangi bir komplikasyon veya ölüm gelişmemiştir.

4.1. Oksidan ve Antioksidan Parametre Bulguları

Gruplara göre ratların karaciğer dokusuna ait oksidan-antioksidan parametreleri ortalama ± standart sapma (Ort. ± SD) değerleri ile istatistiksel analizleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 4.1: Kontrol ve Deney Gruplarının Karaciğer Dokusunda Oksidan-Antioksidan Parametreler

Oksidan-Antioksidan Parametreler	Kontrol Grubu (n=10)	Deney Grubu (n=16)	*p* değeri
MDA (nmol/mg)	0,29±0,08	0,36±0,07	0,021
SOD (U/mg)	95,00±19,33	108,00±33,52	0,277
CAT (IU/mg)	111,20±4,34	105,63±10,15	0,115
GSH-Px (IU/mg)	0,018±0,010	0,022±0,013	0,375
XO (mIU/mg)	0,51±0,14	0,43±0,12	0,129

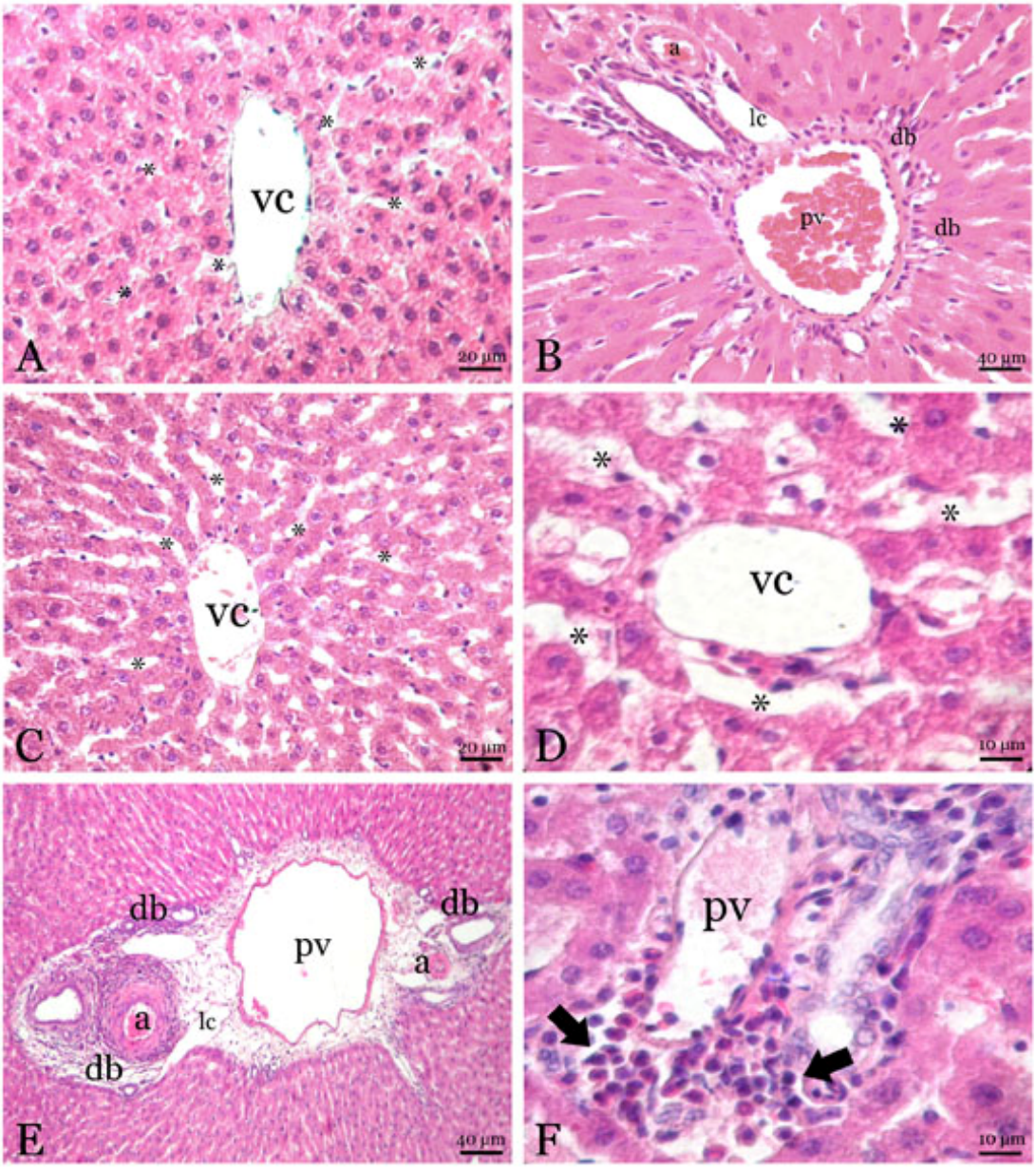
4.2. Biyokimyasal Bulgular

Gruplara göre ratların kan biyokimya değerleri ortalama ± standart sapma (Ort. ± SD) değerleri ve ortanca (min-maks) ile istatistiksel analizleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 4.2: Kontrol ve Deney Gruplarının Kan Biyokimya Değerleri

Biyokimyasal Parametreler	Kontrol Grubu (n=10)	Deney Grubu (n=16)	*p* değeri
ALT (U/L)	70,6±16,5	62,3±11,0	0,147
AST (U/L)	165 (110-205)	165 (119-366)	0,643
ALP (U/L)	237 (133-469)	180 (72-255)	0,004
GGT (U/L)	2,75 (0,20-19,10)	5,20 (0,70-30,80)	0,567
CRP (mg/L)	0,07 (0,03-0,34)	0,04 (0,01-0,11)	0,036

4.3. Histopatolojik Bulgular



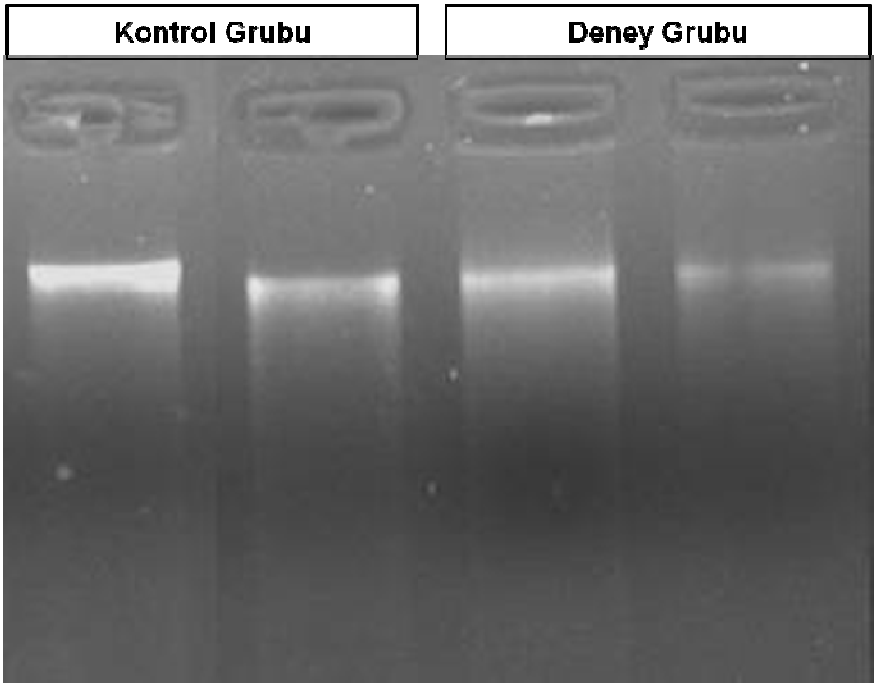
Şekil 4.1: Kontrol ve Deney Grubu Karaciğer Dokusu Kesitlerinin Işık Mikroskobisi Görüntüleri (Hematoksilen-Eozin Boyasıyla)

A ve B: Kontrol grubu doku örnekleri. C, D, E ve F: Deney grubu doku örnekleri. **vc**: vena centralis, *: sinuzoidler (endotel hücreleri ile hepatositler arasında). Karaciğer portal alanda **pv**: Hepatik portal venin terminal dalları, **db**: safra kanalları, **a**: Hepatik arterin terminal dalları, **lc**: lenfatik kapiller. **Ok işareti**: Portal alanda hücre infiltrasyonu.

Kontrol grubu karaciğer dokusu örneklerinde karaciğerin normal lobül yapısı (Şekil4.1A) ile hepatik portal venin ve hepatik arterin terminal dalları, lenfatik kapiller ve safra kanallarından oluşan tipik portal alan (Şekil4.1B) gözlenmektedir. Deney grubunun karaciğer dokusu histopatolojik incelemelerinde sinuzoidlerde belirgin dilatasyon saptanmıştır (Şekil4.1C,D). Portal alanda yer yer hücre infiltrasyonu (Şekil4.1F) dışında herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir (Şekil4.1E).

4.4. Doku DNA Ekstraksiyon Bulguları

Dokulardan elde edilen DNA'lar kitinin protokolüne uygun olarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde 90 voltta 40 dakika yürütülmüş ve görüntülenmiştir.



Şekil 4.2: Dokulardan elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

Her iki grubun elde edilen görüntülerinde herhangi bir fragmantasyon saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda tüm dünyada, obezite, tip 2 diabet ve kardiyovaskuler hastalıkların prevelansındaki önemli artışa bağlı olarak şekersiz (tatlandırıcı içeren) ve kalorisi azaltılmış yiyecek ve içecek kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

Stevia *rebaudiana* yapraklarında temel tatlı bileşen olan stevioside, sukrozdan 200-350 kat tatlı olup, yıllardır Brezilya ve Paraguay'da doğal tatlandırıcı ve antihiperglisemik ajan olarak kullanılmaktadır (6).

Stevia bitkisinin yaprakları birçok tatlandırıcı ile karşılaştırıldığında fonksiyonel özellikler ve etkileri açısından çeşitli üstünlüklere sahip, özellikle diabetik hastalar ve kalori kısıtlaması yapan kişilerin kullanabileceği ısıya dayanıklı, kalorisiz ve sofra şekerine göre 100-300 kat daha tatlı olan doğal bitkisel bir tatlandırıcıdır (8).

Stevia, meyve suyu, kurutulmuş deniz ürünleri, soya sosu, şeker, sakız, yoğurt, dondurma, diş macunu gibi birçok gıda ve çeşitli ürünlerde tatlandırıcı amaçla gün geçtikçe artan bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ortaya konmuş antihiperglisemik, antihipertansif, antiinflamatuar, antioksidan özelliklerinin yanında halen toksisitesi ve karsinojenitesi tartışmalı olan bir tatlandırıcıdır.

Yüzyıllardır tüketilmesine rağmen stevianın katkı maddesi olarak kullanımına yönelik geniş kapsamlı klinik çalışmalar mevcut değildir. Sağlıklı bireylere üç gün boyunca 6 saatte bir 5 g S. *rebaudiana* yapraklarından hazırlanan özüt verilmiş ve bireylerin glukoz toleransında artış, plazma glukoz düzeylerinde ise azalma saptanmıştır (8). Ayrıca steviol ve steviosid doğrudan pankreastaki beta hücrelerini etkileyerek insulin salınımını uyardığı gösterilmiştir. Bu nedenle tip 2 diabet hastalarında kullanılabilecek potansiyele sahip bir bitkidir (89). Gösterilmiş antihiperglisemik etkinliğinin olması, kalorisiz oluşu ve doğal kaynaklı bir tatlandırıcı olması sebebiyle hem sağlıklı bireyler hem de diabetikler tarafından gün geçtikçe kullanımında artış görülmektedir.

Tatlandırıcı olması özelliği ile birçok şeker ve şeker ürünleri uzun süreli kullanıldığında diş çürüklerine neden olmaktadır. Ancak diğer bir taraftan uzun süreli stevia ürünlerinin kullanımı ile diş sağlığına yönelik yapılan bir çalışmada % 0,5 steviosid veya % 0,5 rebaudiosid A içeren diyet ile beş hafta boyunca beslenen

ratlarda diş çürüğü oluşumuna yönelik herhangi bir risk gösterilememiştir (8). Çalışmamızda gruplar arasında bu konuda herhangi bir fark saptanmamıştır.

Oral alımı takiben kolondaki bakteriler tarafından steviosid, steviole indirgenmekte ve steviolün bir kısmı kolondan emilerek portal dolaşımla karaciğere taşınmaktadır. Steviol, steviosidin kan dolaşımındaki major metabolitidir. Karaciğerde oluşan steviol glukronidleri dolaşıma geçerek böbreklerde süzülüp idrarla atılmaktadır (10). Bu nedenle özellikle karaciğerdeki metabolizması önemlidir. Bazı çalışmalarda çeşitli yolaklar üzerinden steviol okside olarak hidroksisteviol, 15-okzo-steviol, steviol-16,17-epoksit veya dihidroksisteviol ürün olarak oluştuğu gösterilmektedir (12).

Bizim çalışmamızda da stevia ve bileşenlerinin metabolizmasında önemli bir yere sahip karaciğer dokusu üzerinde olası oksidan ve/veya antioksidan etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde stevianın dokularda oksidan ve/veya antioksidan parametreler üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir hayvan çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız bu alanda yapılan ilk çalışma olarak kabul edilebilir. Literatürdeki çalışmalar çoğunlukla stevia ve bileşenlerinin olası genotoksisitesi ve mutajenik etkileri üzerinedir. Ancak çalışmaların sonuçları halen tartışmalıdır.

Birçok çalışmada steviosid ve stevia bileşenlerinin mutasyon oluşturabilme riski araştırılmaktadır. Yapılan iki çalışmada steviolün doz bağımlı pozitif mutajenik etki oluşturduğu ancak steviosidin böyle bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (38,91). Bunun yanında steviosid ve steviolün herhangi bir mutajenik etkiye neden olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (8). Bu çelişkili sonuçlar nedeniyle Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), stevia ürünlerinin tamamıyla güvenli olduğu gösterilene kadar şeker yerine kullanılabilecek bir bitki olarak tanıtımı konusunda dikkatli davranmaktadır.

Stevia ürünlerinin oral tüketiminde steviosidin olası karsinogenez etkisi steviolün mutasyon oluşturabilmesiyle ilişkilendirilmektedir. Çünkü steviol steviosidin major metabolitidir ve steviol şeklinde absorbe olmaktadır. Bunun yanında steviosidin saflığı ve kullanım dozları da karsinogenez çalışmalarında dikkat edilmesi gereken bir konudur (43).

Daha önceleri yapılan bakteriyel genetik incelemelerde steviolün genotoksik etki potansiyeli araştırılmıştır. S. *typhimurium* TM677'nin kullanıldığı bir analizde, 100 μg/ml steviol karaciğer homojenatı ile metabolik aktivasyona uğradıktan sonra steviolün hem toksik hem de mutajenik etkisi saptanmıştır (39).

S. typhimurium'un TM677 suşunun rat karaciğeri ile metabolik aktivasyonu ile çeşitli metabolitler oluşmaktadır. Steviol ve metabolitleri olan steviol-16α,17-epoksit, 15-hidroksi-steviol, 15-okzo-steviol, steviol metil ester, 16-okzo-steviol metil ester, 3,16-seko-13-okzo-steviol metil ester, 3,16-seko-13-hidroksi-steviol metil ester ve steviol metil ester 8,13-lakton'un bu suş üzerinde mutajenik etkileri tespit edilmiştir. Ancak tatlandırıcı olarak kullanıldığı dozlarda bu etkilerin göz ardı edilebilir olduğu kabul edilmektedir (40).

7 *xgprt* geni mutant olan plazmid ile yapılan araştırmada aktif steviol metabolitlerinin delesyonlara neden olduğu gösterilmiştir (90). Ayrıca TM677 suşu ile yapılan çalışmada *gpt* geninde baz çifti değişiklikleri saptanmıştır (41). Ancak steviolün mutajenik mekanizmasının küçük delesyonların gösterilmesi ile açıklanamayacağı, mutasyonların bileşiğin saflığıyla da ilgili olabileceği düşünülmektedir (90).

Bizim çalışmamızda standart rat yemine ek olarak bir ay süreyle günde 22 mg stevia özütü içeren bir tatlandırıcı gastrik lavaj yoluyla ratlara verilmiştir. Oluşturulan beslenme modeli günlük kullanılabilir maksimum doz olarak kabul edilen 1 mg/kg doz steviositten kaynak almaktadır (2) ve bu doz 100 kat kadar artırılarak hayvanlara uygulanmıştır.

Stevia, steviosid veya bileşenlerinin kullanımının dokular üzerine olası oksidan ve/veya antioksidan etkilerine yönelik daha önce yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından bu çalışma 22 mg/gün stevia özütü içeren bir tatlandırıcının karaciğer dokusu üzerindeki oksidan ve/veya antioksidan etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre stevia özütü alan grupta MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir yükseklik saptandı (p=0,021). MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olup oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. Hücre membranında iyon geçirgenliğini artırıp çeşitli enzim aktivitelerinde değişime neden olur. Ayrıca DNA bazları ile rahatlıkla reaksiyona girerek mutajenik, genotoksik ve kanserojenik özellik gösterebilir (57).

45 gün boyunca içme sularına steviosid (4 mg/ml) eklenen ratlarla yapılan bir çalışmada ise comet analiziyle steviosidin periferik kan, karaciğer, beyin ve dalak hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğu saptanmıştır. Gelişen DNA hasarından rebaudiosid gibi diğer steviol glikozidlerinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (45,90).

Steviol, kültür hücrelerinde, DNA hasarı ve hücre mutasyonu için yapılan çalışmalarda negatif sonuç vermiştir. Hücre kültürü çalışmalarında L5178Y fare lenfoma hücrelerinde 341 µg/ml dozda kullanılan steviolün *tk* geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Ayrıca kültür hücreleri çalışmalarının yanında in vivo araştırmaların DNA hasarı, kromozomal kırıklar ve hücre mutasyonuna yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda ratlara 4 g/kg steviol oral olarak verilmiş ve negatif sonuç alınmıştır (90). Steviol ve aktif metabolitlerinin DNA polimerazı duyarlılaştırarak çeşitli gen ürünleriyle etkileştiği düşünülmektedir. Bu özelliği ile steviol, bakteri DNA metabolizmasının verdiği yanıt açısından özgündür ve bu sebeple memeli hücrelerinde in vitro veya in vivo DNA hasarı saptanamamıştır. Çalışmamızda ratların karaciğer doku DNA'sı ekstrakte edilerek değerlendirilmiştir. Buna göre iki grup arasında herhangi bir fark saptanmamıştır.

344 ratlarda yapılan bir çalışmada, % 2,5 ve % 5 konsantrasyonlarında yüksek saflıkta (% 95,6) steviosid içeren diyetle 104 hafta boyunca beslenmişler ve steviosidin uzun süreli kullanımına bağlı etkiler incelenmiştir ve hiçbir organ ve dokuda tedaviye bağlanabilecek neoplastik veya nonneoplastik lezyon saptanmamıştır. Bu süre sonunda ratların vücut ağırlıklarında ve hayatta kalım oranlarında dozla orantılı hafif azalma görülmüştür. Organ ağırlıkları incelendiğinde, % 5 ile beslenenlerde böbrek ağırlıkları azalırken beyin ağırlığında artma saptanmıştır. Organ veya dokulardaki tümör gelişimi değerlendirildiğinde kontrol grubu da dahil tüm gruplarda çeşitli lezyonlar saptanmıştır. Örneğin hem kontrol grubunda ve hem de steviosid alan grupta hepatoselluler adenom, pütiter bezde adenom, feokromasitoma, akciğer bronşioalveolar adenom oluşumu gösterilmiştir. Ancak bunların spontan gelişen lezyonlar olabileceği düşünülmüştür (43). Yüksek konsantrasyonlarda steviosid kullanımına rağmen herhangi bir karsinojenik aktivitenin gelişmemesi, bunun yanında TM677 suşlarında mutajenik etkinin gözlenmesi TM677 suşlarına özgün genotoksik yanıta bağlı olduğu düşünülmektedir.

Ancak çalışmamızda stevia özütü kullanan deney grubunun karaciğer dokusunun histopatolojik incelemelerinde sinuzoidlerde belirgin dilatasyon ve portal alanda yer yer hücre infiltrasyonu saptanmıştır.

S. *rebaudiana*'nın yüksek fenolik içeriğinden dolayı doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada standart askorbik asit ile karşılaştırıldığında askorbik asite göre daha güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (28).

Çalışmamızda 22 mg/gün stevia özütü kullanımının deney grubunda antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükseklik saptanmıştır.

SOD süperoksit radikalinin diğer serbest radikallerin üretimini engellemek, hücreyi lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. GSH-Px ise biyolojik membranların yapı ve fonksiyonu korunmaktadır. Çalışmamızda karaciğer dokusunda saptanan artmış oksidatif strese bağlı olarak dokuda antioksidan savunma sistemi devreye girmiş ve artmış SOD ve GSH-Px aktivitesi olarak yanıt oluşturmuştur. Böylece artmış antioksidan yanıt dokuyu lipid peroksidasyonunu karşı korumaya çalışmışsa da MDA düzeylerini düşürmeye yeterli olamamış ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunun gelişimine engel olamamıştır.

İn vivo ve in vitro birçok çalışmada steviosidin antiinflamatuar etkisinin varlığı ortaya konmuştur. Steviosid ve steviol, insan kolon epitel hücreleri üzerinde antiinflamatuar etki göstermektedir. Yapılan bir çalışmada insan kolon hücre serisinde toksik olmayan dozlarda steviosid (<2 mM) ve steviol (<0,2 mM) kullanılmıştır ve steviolün TNF-α tarafından indüklenmiş IL-8 salınımını baskıladığı ve immunoblast incelemesinde steviolün NF-κB ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (33). Steviosidin in vivo immunmodülatör etkisinin ortaya konduğu çalışmada, steviosid ile beslenen farelerde uyarılmış fagositik fonksiyon ve artmış humoral yanıt saptanmıştır. İn vitro deneylerde ise steviosidin fagositik aktivite ile B ve T hücre proliferasyonunu uyardığı ortaya konmuştur (34). Bu nedenle enfeksiyonlara karşı bağışıklığı desteklemesi nedeniyle steviosidin oral kullanımı faydalı olabilir. Çalışmamızda gruplarda akut faz reaktanlardan biri olan CRP düzeyleri incelenmiştir. Stevia özütünün kullanıldığı grupta CRP düzeyleri kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüklük saptanmıştır. Saptanan bu bulgular stevianın antiinflamatuar etkinliğini desteklemektedir.

Steviosid oral olarak LD_{50} > 15 g/kg VA şeklinde kullanıldığında oldukça az akut oral toksisiteye sahiptir (90). Hem sağlıklı bireylerde hem de diabet ve hipertansiyonu olan hastalarda yapılan bir çalışmada, 3 ay boyunca 750 mg/gün steviosid kullanımının karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile serum elektrolitlerinde herhangi bir anormallik saptanmamış olup steviosidin vücut tarafından iyi tolere edildiği düşünülmektedir (37). Çalışmamızda deney gruplarında karaciğer fonksiyon testleri çalışılmıştır. Gruplar arasında ALT, AST ve GGT aktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak histopatolojik olarak sinuzoidlerde dilatasyon gözlenmiştir.

JECFA'ya göre steviosidin in vivo ve in vitro genotoksisitesi olduğunu gösteren kanıt mevcut değildir. Erkeklerde 2,0 g/kg ve kadınlarda 2,4 g/kg steviosid kullanımı herhangi bir kanser insidansını etkilememektedir (2).

2000 yılında Avrupa Komisyonu, kritik bilimsel rapor eksikliği ve yayınlanan çalışmalardaki steviosid ve özellikle steviolün olası toksik etkileri konusundaki çelişkiler nedeniyle stevia ya da steviosidi yeni geliştirilen gıda desteği olarak kabul etmemiştir (6). Ancak son zamanlarda FDA onayını alan ve tatlandırıcı olarak piyasada satışa sunulan ürünler mevcuttur.

Dayanıklı olması, kalorisiz olması, şeker tüketimini azalttığı için ağız ve diş sağlığını koruması, diabet ve fenilketonüri hastalarında kullanılabilir olması nedeniyle pek çok kişi tarafından tatlandırıcı amaçlı diyet katkısı olarak kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Her ne kadar toksik olmadığı, mutajenik olmadığı ve kansere neden olmadığı düşünülüyorsa da diğer bir yandan rat karaciğerinde çeşitli histopatolojik değişikliklerin saptanması, fare, hamstır ve ratlardaki düşük oral toksisite ile periferik kan, karaciğer ve dalak hücrelerinde gözlenen DNA lezyonları (92) sonuçların tartışmalı olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada analiz edilen oksidan ve antioksidan parametrelerden elde edilen bulgular, stevianın tatlandırıcı olarak yüksek dozda kullanıldığında karaciğer dokusunda oksidan hasara neden olacağını işaret etmektedir.

Çalışmamızda 22 mg/gün dozunda stevia özütü içeren bir tatlandırıcının bir ay süreyle kullanımının ratların karaciğer dokusunda belirgin bir oksidatif strese neden olduğu saptanmıştır. Bu oksidasyon durumunun devamında çeşitli radikalik reaksiyonların gelişimine neden olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan doz günlük kullanılabilir dozun yaklaşık 100 katıdır ve bu dozda deney grubunun karaciğer dokularında histopatolojik olarak sinüzoidal dilatasyon saptanmıştır. Bunun yanında DNA düzeyinde belirgin bir hasar gözlenmemiştir. Kullanım süresinin bir ay olması ve hali hazırda oksidan stresin de saptanması sebebiyle ileride daha uzun süreli etkilerinin gözlenebileceği çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu tatlandırıcıyı kullanan bireylerdegeniş ölçekli ve uzun takiplerin yapıldığı çalışmalar gerekli görülmektedir.

ÖZET

Stevianın Rat Karaciğerinde Oksidan/Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması

Son yıllarda diabet, obezite gibi metabolik hastalıkların prevelansındaki artışa bağlı olarak kalorisiz yiyecek ve içeceklerin kullanımı giderek artmaktadır. Bu ihtiyaca yanıt olarak doğal bir kaynak olan Stevia r*ebaudiana* bitkisinden elde edilen stevia özütü ya da bileşenlerini içeren tatlandırıcılar piyasaya sürülmektedir. Bu çalışmada stevia özütü içeren bir tatlandırıcı verilen ratlarda, stevia ve onun oksidatif metabolitlerinin oksidan/antioksidan sistem parametrelerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 26 adet yetişkin Wistar ırkı albino rat (sıçan) kullanıldı. Ratlar, rastgele kontrol (n=10) ve deney grubu (n=16) şekilde iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup 1) bir ay boyunca yalnızca standart rat yemiyle beslenirken, deney grubu (Grup 2) da bir ay boyunca standart rat yemine ilave olarak günde içeriğinde 22 mg stevia özütü bulunan bir tatlandırıcı orogastrik lavaj yoluyla verildi. Çalışma sonunda ratlar sakrifiye (kurban) edilerek karaciğer dokuları çıkarıldı. Bu dokularda oksidan ve antioksidan parametrelerin (Malondialdehit-MDA düzeyleri, Süperoksit Dismutaz-SOD, Katalaz-CAT, Glutatyon Peroksidaz-GSH-Px ve Ksantin Oksidaz-XO enzim aktiviteleri) analizi yapıldı. Buna ek olarak biyokimyasal analiz, histopatolojik inceleme ve doku DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Çalışmada sonuçlarına göre, stevia özütü alan deney grubunun karaciğer dokusunda MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik saptanmıştır (p=0,021). Buna ek olarak SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükseklik bulunmuştur. Deney grubunun karaciğer dokusu histopatolojik incelemelerinde sinuzoidlerde belirgin dilatasyon ve portal alanda yer yer hücre infiltrasyonu dışında herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca DNA düzeyinde her iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Oksidan ve antioksidan parametrelerden elde edilen bulgular, stevianın tatlandırıcı olarak yüksek dozda kullanıldığında karaciğer dokusunda oksidan hasara neden olacağını işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: oksidan/antioksidan denge, Stevia r*ebaudiana*, stevia özütü, tatlandırıcı, karaciğer dokusu

SUMMARY

Investigation of Effects of Stevia on Oxidant and Antioxidant Status in Liver Tissue of Rats

Nowadays according to the increased prevalence of metabolic disorders such as diabetes and obesity, there is an increasing trend of consumption of non-caloric foods and drinks. As a result of this situation there is a widely use of the extracts of a natural plant, Stevia r*ebaudiana*, or its compounds as a sweetener. In this study, it was aimed to investigate the effects of stevia and its oxidative compounds on oxidant/antioxidant parameters in liver tissue from rats.

For this aim, 26 adult Wistar type albino rat were used in the study. The animals were divided into two groups as the control group (n=10) and the study group (n=16) randomly. While the control group (Group 1) was fed only by standard rat diet, the study group (Group 2) was fed by standard rat diet with a sweetener including 22 mg stevia extract per day aurogastricly for one month. At the end of the study, rats were sacrified and the liver tissues were surgically removed to analyze the oxidant and antioxidant parameters (Malondialdehyde-MDA levels, Superoxide Dismutase-SOD, Catalase-CAT, Glutathione Peroxidase-GSH-Px, and Xantine Oxsidase-XO enzyme activities). Also biochemical analysis, histopathological examination and tissue DNA extraction were done.

According to the results of the study in liver tissues, MDA levels of the study group which were fed by stevia extract were found significantly higher than that in the control group (p=0,021). However, SOD and GSH-Px enzyme activities were lower than that in the control group which was not significant. The tissues of the group 2 displayed some histopathological changes such as remarkable dilatation of sinusoids. There were no histopathological changes in the structure of hepatocytes and also we did not observe any apoptotic or necrotic cell and histopathological changes in the portal area, except the cellular infiltration in a few focal portal areas. There was no difference between groups according to DNA extraction findings.

According the data of oxidant and antioxidant parameters, it was thought that the consumption of high dose of stevia as a sweetener may cause oxidant effects on liver tissues.

Key Words: oxidant/antixsidant status, Stevia r*ebaudiana*, stevia extract, sweetener, liver tissue

KAYNAKLAR

1. Williams LD, Burdock GA. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 1831-6.
2. Chatsudthipong V, Muanprasat C.Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* 2009; 121: 41-54.
3. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from Stevia rebaudiana extracts by human microflora. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 6618-22.
4. Shukla S, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 2338-43.
5. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: S1-S10.
6. Geuns, JM. Stevioside. *Phytochemistry.* 2003; 64: 913−921.
7. Uchiyama H, Tozuka Y, Imono M, Takeuchi H. Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 76: 238-44.
8. Goyal SK, Samsher, Goyal RK. Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 2010; 61: 1-10.
9. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41: 359-74.
10. Geuns JM, Buyse J, Vankeirsbilck A, Temme EH. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Exp Biol Med*. 2007; 232: 164-73.
11. Cardoso VN, Barbosa MF, Muramoto E, Mesquita CH, Almeida MA. Pharmacokinetic studies of 131I-stevioside and its metabolites. *Nucl Med Biol*. 1996; 23: 97-100.

12. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41: 875-83.
13. Wheeler A, Boileau AC, Winkler PC, Compton JC, Prakash I, Jiang X, Mandarino DA. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 54−60.
14. Roberts A, Renwick AG. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 31-9.
15. Srimaroeng C, Chatsudthipong V, Aslamkhan AG, Pritchard JB. Transport of the natural sweetener stevioside and its aglycone steviol by human organic anion transporter (hOAT1; SLC22A6) and hOAT3 (SLC22A8). *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 313: 621-8.
16. Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*. 2002; 9: 9-14.
17. Barriocanal LA, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez JT, Jimenez N, Rojas V. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008; 51: 37-41.
18. Nordentoft I, Jeppesen PB, Hong J, Abudula R, Hermansen K. Isosteviol increases insulin sensitivity and changes gene expression of key insulin regulatory genes and transcription factors in islets of the diabetic KKAy mouse. *Diabetes Obes Metab.* 2008; 10: 939−949.
19. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SED, Jepsen M, Colombo M, Agger A. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*. 2003; 52: 372−378.
20. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2004; 53: 73-6.

21. Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2002; 132: 566−569.
22. Dyrskog SE, Jeppesen PB, Colombo M, Abudula R, Hermansen K. Preventive effects of a soy-based diet supplemented with stevioside on the development of the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism.* 2005; 54: 1181-8.
23. Jeppesen PB, Kyrskog SE, Aggersen XJ, Hermansen K. Can stevioside in combination with a soy-based dietary supplement be a new useful treatment of type 2 diabetes? An in vivo study in the diabetic goto-kakizaki rat. *Rev Diabet Stud.* 2006; 3: 189−199.
24. Park J, Cha Y. Stevia rebaudiana Bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Sci Food Agric.* 2010; 90: 1099-1105.
25. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH, Cheng JT. A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2000; 50: 215-220.
26. Lee CN, Wong KL, Liu JC, Chen YJ, Cheng JT, Chan P. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med.* 2001; 67: 796-9.
27. Bornia EC, do Amaral V, Bazotte RB, Alves-Do-Prado W. The reduction of arterial tension produced by stevioside is dependent on nitric oxide synthase activity when the endothelium is intact. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44: 1-8.
28. Shukla S, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 2338-43.
29. Ghanta S, Banerjee A, Poddar A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 10962-7.
30. Yasukawa K, Kitanaka S, Seo S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25: 1488−1490.

31. Mizushina Y, Akihisa T, Ukiya M, Hamasaki Y, Murakami-Nakai C, Kuriyama I. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sci.* 2005; 77: 2127−2140.
32. Takasaki M, Konoshima T, Kozuka M, Tokuda H, Takayasu J, Nishino H, Miyakoshi M, Mizutani K, Lee KH. Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17: 600-5.
33. Boonkaewwan C, Ao M, Toskulkao C, Rao MC. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 3777−3784.
34. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact*. 2008; 173: 115−121.
35. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. *Antiviral Res*. 2001; 49: 15-24.
36. Srimaroeng C, Jutabha P, Pritchard JB, Endou H, Chatsudthipong V. Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters in S2 cells and mouse renal cortical slices. *Pharm Res.* 2005; 22: 858-66.
37. Barriocanal LA, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez JT, Jimenez N, Rojas V. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008; 51: 37-41.
38. Matsui M, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, Sawada M, Hayashi M, Nohmi T, Yoshihira K, Ishidate M Jr, Sofuni T. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis.* 1996; 11: 573-9.
39. Pezzuto JM, Compadre CM, Swanson SM, Nanayakkara D, Kinghorn AD. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82: 2478-82.

40. Terai T, Ren H, Mori G, Yamaguchi Y, Hayashi T. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in Salmonella typhimurium TM677. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2002; 50: 1007-10.
41. Matsui M, Sofuni T, Nohmi T. Regionally-targeted mutagenesis by metabolically-activated steviol: DNA sequence analysis of steviol-induced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (gpt) gene of Salmonella typhimurium TM677. *Mutagenesis.*1996; 11: 565-72.
42. Nunes AP, De Mattos JC, Ferreira-Machado SC, Nunes RM, Asad NR, Dantas FJ, Bezerra RJ, Caldeira-de-Araujo A. Biological effects of stevioside on the survival of Escherichia coli strains and plasmid DNA. *Mol Cell Biochem*. 2006; 293: 187-92.
43. Toyoda K, Matsui H, Shoda T, Uneyama C, Takada K, Takahashi M. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 1997; 35: 597-603.
44. Sekihashi K, Saitoh H, Sasaki Y. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *J Toxicol Sci*. 2002; 27: 1-8.
45. Nunes AP, Ferreira-Machado SC, Nunes RM, Dantas FJ, De Mattos JC, Caldeira-de-Araújo A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 662-6.
46. Geuns JM, Bruggeman V, Buyse JG. Effect of stevioside and steviol on the developing broiler embryos. *J Agric Food Chem*. 2003; 13: 5162-7.
47. Sözmen, Eser. Yaşlanma Biyokimyası. [yazan] Taner Onat, Kaya Emerk ve Eser Sözmen. *İnsan Biyokimyası.* Ankara : Palme Yayıncılık, 2002: 665-674.
48. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası*. 1995: 253-262.
49. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.* Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
50. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002; 33: 110 - 118.
51. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem*. 2006; 31: 51-56.

52. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
53. Ahsan H, Ali A, Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin Exp Immunol*. 2003; 131: 398-404.
54. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18: 872-9.
55. Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr.* 2009; 20: 303-10.
56. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, Slikker W. Nitrative and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci.* 2009; 112: 4-16.
57. Fukuzawa K. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidion of alpha-tocopherol in membranes. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2008; 54: 273-85.
58. Young, IS ve Woodside, JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 176–186.
59. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest.* 1991; 100: 176S-181S.
60. Baudry N, Laemmel E, Vicaut E. In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physio*. 2008; 294: 821-8.
61. George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag.* 2009; 5: 265-72.
62. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1997: 92-95.
63. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*. 2007; 2: 377-87.
64. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160: 1-40.

65. McCord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med*. 2000; 108: 652-9.
66. Aniya Y, Daido A. Activation of microsomal glutathione S-transferase in tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress of isolated rat liver. *Jpn J Pharmacol.* 1994; 66: 123-30.
67. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 116: 38-43.
68. Lakari, E. *Expression of oxidant and antioxidant enzymes in human lung and interstitial lung diseases.* Oulu: Oulu University Press, 2002.
69. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 3298-305.
70. Campos C, Guzmán R, López-Fernández E, Casado A. Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome. *Clin Biochem*. 2010; 43: 228-33.
71. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 933-56.
72. Maroz A, Anderson RF, Smith RA, Murphy MP. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46: 105-9.
73. Roche, V, et al. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters.* 2008: 1783–1787.
74. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 573-89.
75. Sautin YY, Johnson RJ. Uric Acid: The Oxidant–Antioxidant Paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008; 27: 608–619.
76. Boban M, Modun D. Uric Acid and Antioxidant Effects of Wine. *Croat Med J.* 2010; 51: 16-22.

77. Stocker, R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6: 841-9.
78. Weihrauch, M. R. ve Diehl, V. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology.* 2004; 15: 1460–1465.
79. Chung MS, Suh HJ, Yoo W, Choi SH, Cho YJ, Cho YH, Kim CJ. Daily intake assessment of saccharin, stevioside, D-sorbitol and aspartame from various processed foods in Korea. *Food Addit Contam.* 2005; 22: 1087-97.
80. Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin.* 2009; 33: 370-7.
81. Alper G. Diyabet. [yazan] Taner O, Kaya E, Eser S. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 248-257.
82. Kawahito S, Kitahata H, Oshita S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 4137-42.
83. Lowry O, Rosenbrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 182: 265-275.
84. Dahle LK, Hill EG, Hollman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys.* 1962; 98: 253-261.
85. Durak İ, Canbolat O, Kaçmaz M, Ozgen G, Oztürk HS. Antioxidant interference in superoxide dismutase activity methods using superoxide radical as substrate. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36: 407-408.
86. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London: Academic Press Inc, 1974: 673-677.
87. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-69.
88. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal Biochem*. 1974; 62: 426-35.

89. Jeppesen PB, Gregersen S, Poulsen CR, Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K^+-channel activity. *Metabolism.* 2000; 49: 208-14.

90. Brusick DJ. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: S83-91.

91. Pezzuto JM, Nanayakkara NP, Compadre CM, Swanson SM, Kinghorn AD, Guenthner TM, Sparnins VL, Lam LK. Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione S-transferase in mice. *Mutat Res*. 1986; 169: 93-103.

92. Benzie, IF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr.* 2000; 39: 53-61.